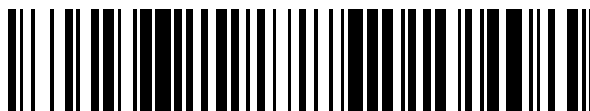


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 710 109**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/113** (2010.01)

**A61K 31/713** (2006.01)

**A61K 31/7088** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.12.2011 PCT/EP2011/073186**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.06.2012 WO12080509**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.12.2011 E 11797324 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.11.2018 EP 2652136**

54 Título: **Ácidos nucleicos que se dirigen a TCTP para su uso en el tratamiento de cánceres quimiorresistentes u hormonorresistentes**

30 Prioridad:

**17.12.2010 EP 10306447**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**23.04.2019**

73 Titular/es:

**INSERM - INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE (50.0%)  
101, rue de Tolbiac  
75013 Paris, FR y  
UNIVERSITE D'AIX-MARSEILLE (50.0%)**

72 Inventor/es:

**ROCCHI, PALMA;  
BAYLOT, VIRGINIE;  
ACUNZO, JULIE;  
ANDRIEU, CLAUDIA y  
KATSOGIANNOU, MARIA**

74 Agente/Representante:

**SALVÀ FERRER, Joan**

ES 2 710 109 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

**DESCRIPCIÓN**

Ácidos nucleicos que se dirigen a TCTP para su uso en el tratamiento de cánceres quimiorresistentes u hormonorresistentes

5

**[0001]** La presente invención definida en las reivindicaciones se refiere a un antagonista de TCTP, en particular, a un ácido nucleico que se dirige a un ARNm que codifica una proteína tumoral controlada traduccionalmente (TCTP), en el que dicho ácido nucleico es capaz de reducir la cantidad de TCTP en las células, para su uso en el tratamiento o la prevención de un cáncer independiente de hormonas o un cáncer quimiorresistente, tal como un cáncer de próstata independiente de andrógenos.

10

**[0002]** El cáncer de próstata (CP) es la neoplasia no cutánea más común entre los hombres en el mundo occidental. Después del cáncer de pulmón, el CP es la segunda causa más común de mortalidad relacionada con el cáncer en los hombres, ya que es responsable de aproximadamente el 13 % de todas las muertes por cáncer. Aunque los pacientes con enfermedad localizada pueden tratarse con cirugía o radiación, la ablación de andrógenos suele ser la terapia inicial en pacientes con enfermedad avanzada o metastásica. Desafortunadamente, la enfermedad progresa gradualmente a un estado metastásico resistente a castración (RC), que sigue siendo incurable. Durante este estado, el crecimiento del tumor avanza en ausencia de andrógenos, provocando la muerte en un plazo de 2 a 3 años después del diagnóstico.

20

**[0003]** Dado que la mayoría de los pacientes finalmente no responden y recaen en 2-3 años con un cáncer de próstata resistente a castración (CPRC), los esfuerzos se han centrado en el desarrollo de terapias no hormonales dirigidas a células resistentes a la castración (RC).

25

**[0004]** Hasta hace poco, la quimioterapia no mostraba un beneficio de supervivencia y solo tenía una función paliativa para los hombres con CPRC. Se ha demostrado la eficacia de docetaxel en CPRC metastásico. Sin embargo, la supervivencia global media se prolongó durante unos pocos meses, lo que resaltó la necesidad de nuevas terapias.

30

**[0005]** El documento WO02/36624 describe un método para inhibir una célula hiperproliferativa proporcionando a la célula una cantidad eficaz de un inhibidor de fortalina, en el que el inhibidor reduce la actividad de fortalina en la célula.

35

**[0006]** Munirathinam Gnanasekar y col. (International Journal of Oncology, Vol. 34, 2009, 1241-1246) describe que el silenciamiento génico de TCTP por ARNi permite inhibir el crecimiento celular e inducir la apoptosis *in vitro* en células de cáncer de próstata humano.

40

**[0007]** El documento WO 03/097835 describe un método para suprimir el crecimiento de una célula cancerosa usando un compuesto que modula la síntesis o expresión del gen *tpt1*. Por ejemplo, la síntesis o expresión del gen *tpt1* se inhibe dirigiéndose específicamente al ADN o ARNm de *tpt1*.

45

**[0008]** Wu-Ling Zhu y col. (Anticancer Research, Vol. 28, 2008, 1575-1580) estudian la expresión del ARNm de TCTP en un modelo de regeneración hepática en rata y tejidos de cáncer hepático en humanos, así como el posible papel de TCTP en la supresión del cáncer hepático.

45

**[0009]** Por lo tanto, existe una necesidad en la técnica de tratamientos eficaces del cáncer de próstata, en particular de CPRC.

**DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION**

50

**[0010]** Los inventores han identificado que la proteína tumoral controlada traduccionalmente (TCTP) se une a la proteína de choque térmico 27 (Hsp27) y que, por lo tanto, la TCTP está protegida a partir de su vía ubiquitina-proteasoma. La inhibición de la interacción TCTP-Hsp27 conduce a la degradación de la proteína TCTP.

55

**[0011]** Se notificó anteriormente que la Hsp27 estaba muy sobreexpresada en el cáncer de próstata resistente a la castración (CPRC). Los inventores han demostrado ahora que la Hsp27 tiene un efecto citoprotector en las células cancerosas, que está mediada por su interacción con TCTP.

60

**[0012]** Se sabe que la TCTP tiene una función en la patogénesis tumoral. Sin embargo, los inventores han hallado de manera sorprendente que la sobreexpresión de TCTP en la sensibilidad a la castración confiere resistencia a la castración y a la quimioterapia a las células.

65

**[0013]** Además, los inventores han identificado oligonucleótidos antisentido (OAS) y ARNs de interferencia pequeños (ARNi) que disminuyen significativamente los niveles de ARNm y proteínas de TCTP. Además, se demostró que los OAS potenciaban los efectos antineoplásicos de la terapia hormonal y de quimioterapia con

docetaxel tanto *in vitro* como *in vivo*.

**[0014]** Los inventores han hallado por ende que los OAS y los ARNip dirigidos a TCTP restauran la sensibilidad a las hormonas y a la quimioterapia en CPRC. Más específicamente, la actividad antineoplásica de los ARNip y OAS de TCTP en células de cáncer de próstata es de gran interés para el uso de estos compuestos como agentes terapéuticos, ya que se espera que no muestren toxicidad como efecto secundario. De hecho, la TCTP está fuertemente sobreexpresada en el 75 % del cáncer de próstata en estadio avanzado, en particular en los tumores primarios y metástasis de CPRC. Por otra parte, no se ha observado expresión alguna de TCTP en tejidos de próstata normales. Incluso las glándulas de cáncer de próstata normales que se encuentran entre las glándulas tumorales de cáncer de próstata no tienen expresión de TCTP.

**[0015]** Una estrategia para mejorar las terapias en el cáncer de próstata avanzado consiste en dirigir genes que se activan por la supresión de andrógenos, ya sea para retrasar o prevenir la emergencia del fenotipo de RC. Se cree que los OAS y los ARNip dirigidos a TCTP tienen esta capacidad. En particular, se cree que la inhibición de la TCTP es capaz de restaurar la sensibilidad de las células cancerosas que se han vuelto resistentes a terapias como la quimioterapia y/o la castración.

Por lo tanto, la presente solicitud describe varios antagonistas de la proteína tumoral controlada traduccionalmente (TCTP), en particular varios ácidos nucleicos que se dirigen al ARNm que codifica TCTP y que es capaz de reducir la cantidad de TCTP en células cancerosas, para su uso en el tratamiento o la prevención de cánceres, preferentemente cáncer resistente a la castración o a la quimioterapia, como por ejemplo CPRC o para sensibilizar a un paciente con cáncer resistente a la castración o a la quimioterapia a la terapia.

**[0016]** La presente invención se define en las reivindicaciones.

## 25 Antagonistas para su uso descrito en esta invención

**[0017]** Como se usa en esta invención, el término "antagonista de TCTP" se refiere a compuestos que inhiben o reducen la actividad biológica de TCTP. La actividad biológica de TCTP depende de la cantidad de la proteína (es decir, su nivel de expresión), así como de la actividad de la proteína. Por lo tanto, el antagonista de TCTP puede reducir o inhibir la expresión de TCTP o la actividad de la proteína TCTP.

**[0018]** Como se usa en esta invención, los términos "proteína tumoral controlada traduccionalmente" y "TCTP" abarcan cualquier isoforma de origen natural de la proteína TCTP, incluida la proteína de la SEQ ID NO: 1, variantes alélicas de la misma, variantes de corte y empalme de la misma y proteínas homólogas en otras especies. Preferentemente, la TCTP es de origen humano. Lo más preferentemente, la TCTP tiene la secuencia de SEQ ID NO: 1.

**[0019]** Los métodos para determinar si un compuesto es un antagonista de TCTP son bien conocidos por los expertos en la materia.

**[0020]** Por ejemplo, los expertos en la materia pueden evaluar si un compuesto reduce o elimina la expresión de TCTP por inmunoelectrotransferencia o por RT-PCR, Elisa (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas) o inmunohistoquímica.

**[0021]** La actividad biológica de la proteína TCTP también se puede evaluar midiendo uno de los fenómenos en los que se sabe que TCTP desempeña un papel. Por ejemplo, se sabe que la TCTP desempeña un papel en la liberación de histamina, en el ciclo celular, en el crecimiento celular, en la apoptosis, en la estabilización de microtúbulos, en el metabolismo del calcio, etc. Un compuesto que reduce o elimina la capacidad de TCTP para desempeñar un papel en uno de estos fenómenos se define como un antagonista de TCTP.

**[0022]** Por ejemplo, determinar si un compuesto es un antagonista de TCTP se puede efectuar midiendo la capacidad de TCTP para causar la liberación de histamina de los basófilos, por ejemplo, usando el método descrito en MacDonald y col. (1995, Science. 269:688-90), en presencia y en ausencia de un compuesto candidato. Un compuesto que reduce o elimina la liberación de histamina se define como un antagonista de TCTP.

**[0023]** Los inventores han descubierto que TCTP es un ligando de Hsp27. La unión de Hsp27 con TCTP protege a la TCTP de su vía ubiquitina-proteasoma, y la inhibición de esa interacción conduce a la degradación de la proteína TCTP (datos no publicados). Por ende, la actividad biológica de TCTP también puede medirse evaluando la capacidad de TCTP para unirse a sus ligandos naturales, como por ejemplo, Hsp27. La unión de TCTP a Hsp27 se puede evaluar, por ejemplo, usando un ensayo de co-inmunoprecipitación, un ensayo pull-down, un sistema de transferencia de energía por resonancia de bioluminiscencia (BRET) o el sistema de dos híbridos de levadura (Y2H). Un compuesto que reduce o anula la unión de TCTP a Hsp27 se define como un antagonista de TCTP.

**[0024]** Como se usa en esta invención, los términos "proteína de choque térmico 27" y "Hsp27" abarcan cualquier isoforma de origen natural de la proteína Hsp27, incluida la proteína de la SEQ ID NO: 16, variantes

alélicas de la misma, variantes de corte y empalme de la misma y proteínas homólogas en otras especies. Preferentemente, Hsp27 es de origen humano. Lo más preferentemente, Hsp27 es la proteína-1 de choque térmico humana de 27 kDa (número de acceso AAH12292) y tiene la secuencia de SEQ ID NO: 16.

5 **[0025]** "Anticuerpo" pretende incluir no solo moléculas de inmunoglobulina completas sino también fragmentos de las mismas como Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fv y otros fragmentos de las mismas que retienen el sitio de unión al antígeno. El término "anticuerpo" también incluye derivados genotecnológicos de anticuerpos tales como moléculas Fv de cadena sencilla (scFv) y anticuerpos de dominio único (dAbs). El término incluye además moléculas similares a anticuerpos, que pueden producirse usando técnicas de expresión en fagos u otras técnicas de selección aleatoria para moléculas. El término incluye todas las clases de anticuerpos y más específicamente IgGs, IgAs, IgMs, IgDs e IgEs.

**[0026]** Aunque el anticuerpo puede ser un anticuerpo policlonal, resulta preferente si es un anticuerpo monoclonal. Un "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo que reconoce solo un tipo de antígeno. El término "anticuerpo monoclonal" abarca tanto los anticuerpos producidos por hibridomas (Kohler y Milstein 1975 Nature 256:495-7) como los anticuerpos recombinantes obtenidos a través de la ingeniería genética. Más específicamente, los anticuerpos monoclonales abarcan anticuerpos quiméricos (Boulianne y col. 1984 Nature 312:643-6), anticuerpos humanizados (Jones y col. 1986 Nature 321:522-5) y anticuerpos completamente humanos que pueden producirse, por ejemplo, por expresión en fagos (Vaughan y col. 1998 Nat. Biotechnol. 16:535-9) o tecnología transgénica (Lonberg 2005 Nat Biotechnol. 23:1117-25).

**[0027]** Los "fragmentos de anticuerpo" comprenden una porción de un anticuerpo intacto, preferentemente la región de unión a antígeno o variable del anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen Fv, Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fab', dsFv, scFv, sc(Fv)<sub>2</sub>, diacuerpos y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos. El término "Fab" denota un fragmento de anticuerpo que tiene un peso molecular de aproximadamente 50.000 y una actividad de unión a antígeno, en la cual aproximadamente la mitad del lado N-terminal de la cadena H y la cadena L completa, entre los fragmentos obtenidos al tratar IgG con una proteasa, papaína, se unen entre sí mediante un enlace disulfuro.

30 **[0028]** El término "F(ab')<sub>2</sub>" se refiere a un fragmento de anticuerpo que tiene un peso molecular de aproximadamente 100.000 y una actividad de unión a antígeno, que es ligeramente más grande que el Fab unido a través de un enlace disulfuro de la región bisagra, entre los fragmentos obtenidos al tratar IgG con una proteasa, pepsina.

35 **[0029]** El término "Fab" se refiere a un fragmento de anticuerpo que tiene un peso molecular de aproximadamente 50.000 y una actividad de unión a antígeno, que se obtiene al cortar un enlace disulfuro de la región bisagra de F(ab')<sub>2</sub>.

**[0030]** Un polipéptido Fv de cadena sencilla ("scFv") es un heterodímero VH::VL enlazado covalentemente que generalmente se expresa a partir de una fusión de genes que incluye genes que codifican VH y VL enlazados por un enlazador codificante de péptidos. El fragmento scFv humano descrito en esta invención incluye CDRs que se mantienen en una conformación apropiada, preferentemente usando técnicas de recombinación génica.

45 **[0031]** "dsFv" es un heterodímero VH::VL estabilizado por un enlace disulfuro. Los fragmentos de anticuerpos divalentes y multivalentes pueden formarse espontáneamente por asociación de scFvs monovalentes, o pueden generarse por acoplamiento de scFv monovalentes por un enlazador peptídico, tal como sc(Fv)<sub>2</sub> divalente.

**[0032]** El término "diacuerpos" se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpos con dos sitios de unión a antígeno, cuyos fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena ligera (VL) en la misma cadena polipeptídica (VH-VL). Al utilizar un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, se obliga a los dominios a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y así crear dos sitios de unión a antígeno.

**[0033]** El antagonista de TCTP es un ácido nucleico que se dirige a un ARNm que codifica una proteína tumoral controlada traduccionalmente (TCTP), y que es capaz de reducir la cantidad de TCTP en las células.

**[0034]** La presente solicitud describe tales ácidos nucleicos que se dirigen a un ARNm que codifica una proteína tumoral controlada traduccionalmente (TCTP), y que son capaces de reducir la cantidad de TCTP en las células.

60 **[0035]** Como se usa en esta invención, un ácido nucleico que "se dirige" a un ARNm se refiere a un ácido nucleico que es capaz de unirse específicamente a dicho ARNm. Es decir, el ácido nucleico comprende una secuencia que es al menos parcialmente complementaria, con especial preferencia perfectamente complementaria, a una región de la secuencia de dicho ARNm, siendo dicha complementariedad suficiente para producir una unión específica en condiciones intracelulares.

**[0036]** Como un experto en la materia apreciará inmediatamente, una secuencia que es "perfectamente complementaria a" una segunda secuencia significa el homólogo del complemento inverso de la segunda secuencia, ya sea bajo la forma de una molécula de ADN o bajo la forma de una molécula de ARN. Una secuencia es  
5 "parcialmente complementaria a" una segunda secuencia si hay uno o más emparejamientos incorrectos.

**[0037]** Los ácidos nucleicos que se dirigen a un ARNm que codifica TCTP pueden ser específicos de TCTP y diseñarse usando la secuencia de dicho ARNm como base, por ejemplo, usando herramientas bioinformáticas. Por ejemplo, la secuencia de SEQ ID NO: 5 se puede usar como base para diseñar ácidos nucleicos que se dirigen a un  
10 ARNm que codifica TCTP.

**[0038]** Los ácidos nucleicos descritos en esta invención son capaces de reducir la cantidad de TCTP en las células, por ejemplo, en células cancerosas tales como las células LNCaP, C4-2 o PC3. Los expertos en la materia conocen los métodos para determinar si un ácido nucleico es capaz de reducir la cantidad de TCTP en las células.  
15 Esto se puede hacer, por ejemplo, analizando la expresión de la proteína TCTP mediante membrana de Western, y comparando la expresión de la proteína TCTP en presencia y en ausencia del ácido nucleico a analizar (véase la Figura 4 y el Ejemplo 5).

**[0039]** Los ácidos nucleicos descritos en esta invención pueden corresponder, por ejemplo, a  
20 oligonucleótidos antisentido o a ARN de interferencia (incluidos ARNip, ARNhcs, miARNs, ARNdcs y otras especies de ARN que pueden escindirse *in vivo* para formar ARNips).

**[0040]** Los ácidos nucleicos descritos en esta invención tienen normalmente una longitud de 12 a 50 nucleótidos, por ejemplo, 12 a 35 nucleótidos, 12 a 30, 12 a 25, 12 a 22, 15 a 35, 15 a 30, 15 a 25, 15 a 22, 18 a 22,  
25 o aproximadamente 19, 20 o 21 nucleótidos.

**[0041]** Los ácidos nucleicos descritos en esta invención pueden, por ejemplo, comprender o consistir en 12 a 50 nucleótidos consecutivos, por ejemplo 12 a 35, 12 a 30, 12 a 25, 12 a 22, 15 a 35, 15 a 30, 15 a 25, 15 a 22, 18 a 22, o aproximadamente 19, 20 o 21 nucleótidos consecutivos de una secuencia complementaria al ARNm que se  
30 une específicamente con la SEQ ID NO: 5.

**[0042]** En particular, los inventores han identificado trece ácidos nucleicos dirigidos a un ARNm que codifica TCTP que son muy eficaces para reducir la cantidad de TCTP en las células (véase la Figura 4 y el Ejemplo 5). Estos ácidos nucleicos se dirigen a las regiones que consisten en los nucleótidos 153 a 173 de la SEQ ID NO: 5, los  
35 nucleótidos 220 a 240 de la SEQ ID NO: 5, los nucleótidos 300 a 320 de la SEQ ID NO: 5 y los nucleótidos 320 a 340 de la SEQ ID NO: 5, respectivamente. Todos estos ácidos nucleicos se dirigen a la región traducida del ARNm de TCTP (que se extiende desde el nucleótido 94 al 612 de la SEQ ID NO: 5).

**[0043]** Por lo tanto, los ácidos nucleicos descritos en esta invención se dirigen preferentemente a una  
40 secuencia que se superpone con los nucleótidos 153 a 173, o con los nucleótidos 221 a 240 o con los nucleótidos 300 a 340 de la SEQ ID NO: 5, dicho ácido nucleico es un ADN o un ARN. Dicho ácido nucleico puede, por ejemplo, dirigirse a:

- una secuencia que consiste en los nucleótidos 153 a 173 o en los nucleótidos 221 a 240 o en los nucleótidos 300 a  
45 320, o en los nucleótidos 320 a 340 de la SEQ ID NO: 5, o
- una secuencia comprendida en los nucleótidos 153 a 173 o en los nucleótidos 221 a 240, o en los nucleótidos 300 a 320, o en los nucleótidos 320 a 340 de la SEQ ID NO: 5, o
- una secuencia parcialmente comprendida en los nucleótidos 153 a 173 o en los nucleótidos 221 a 240, o en los  
50 nucleótidos 300 a 320, o en los nucleótidos 320 a 340 de la SEQ ID NO: 5.

**[0044]** Los ácidos nucleicos descritos en esta invención pueden comprender, por ejemplo, un fragmento de al menos 10 nucleótidos consecutivos de una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en la SEQ ID NO: 2 (5'-ACCAATGAGCGAGTCATCAA-3'), SEQ ID NO: 3 (5'-AACCCGUCGCGAUCUCCCGG-3'), SEQ ID NO: 14 (5'-AACTTGTTTCCTGCAGGTGA-3'), SEQ ID NO: 15 (5'-TGGTTCATGACAATATCGAC-3'), SEQ ID NO: 17 (5'-  
55 TAATCATGATGGCGACTGAA -3'), SEQ ID NO: 25 (5'-ACCAGTGATTACTGTGCTTT-3'), SEQ ID NO: 26 (5'-CTTGTAGGCTTCTTTTGTGA-3'), SEQ ID NO: 27 (5'-ATGTAATCTTTGATGTACTT-3'), SEQ ID NO: 28 (5'-GTTCCCTTTGATTGATTC-3'), SEQ ID NO: 29 (5'-TTCTGGTCTGTCTTCAA-3'), SEQ ID NO: 34 (5'-AGAAAATCATATATGGGGTC-3'), SEQ ID NO: 36 (5'-TTAACATTTCTCCATTTCTA-3'), SEQ ID NO: 38 (5'-GTCATAAAAGGTTTTACTCT-3') y SEQ ID NO: 40 (5'-GAAATTAGCAAGGATGTGCT-3'). Más preferentemente, los  
60 ácidos nucleicos descritos en esta invención comprenden una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 38 y SEQ ID NO: 40. Los ácidos nucleicos descritos en esta invención pueden comprender, por ejemplo, un fragmento de al menos 10 nucleótidos consecutivos de una secuencia de SEQ ID NO: 2 o de una secuencia de SEQ ID NO: 14, o de una  
65 secuencia de SEQ ID NO: 15, o de una secuencia de SEQ ID NO: 3. Lo más preferentemente, comprenden una

secuencia de SEQ ID NO: 2, o una secuencia de SEQ ID NO: 14, o una secuencia de SEQ ID NO: 15 o una secuencia de SEQ ID NO: 3.

**[0045]** En una realización preferida descrita en esta invención, el ácido nucleico es un oligonucleótido antisentido. La molécula antisentido puede ser una molécula de ADN o de ARN.

**[0046]** Dicho oligonucleótido antisentido puede, por ejemplo, comprender o consistir en un fragmento de al menos 10, 12, 15, 18 o 20 nucleótidos consecutivos de una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en la SEQ ID NO: 2 (5'-ACCAATGAGCGAGT-CATCAA-3'), SEQ ID NO: 14 (5'-AACTTGTTTCCTGCAGGTGA-3'), SEQ ID NO: 15 (5'-TGGTTCATGACAATATCGAC-3'), SEQ ID NO: 17 (5'-TAATCATGATGGCGACTGAA-3'), SEQ ID NO: 25 (5'-ACCAGTGATTACTGTGCTTT-3'), SEQ ID NO: 26 (5'-CTTGTTAGGCTTCTTTTGTGA-3'), SEQ ID NO: 27 (5'-ATGTAATCTTTGATGACTT-3'), SEQ ID NO: 28 (5'-GTTTCCCTTTGATTGATTTTC-3'), SEQ ID NO: 29 (5'-TTCTGGTCTCTGTTCTTCAA-3'), SEQ ID NO: 34 (5'-AGAAAATCATATATGGGGTC-3'), SEQ ID NO: 36 (5'-TTAACATTTTCCATTCTA-3'), SEQ ID NO: 38 (5'-GTCATAAAAGGTTTACTCT-3') y SEQ ID NO: 40 (5'-GAAATTAGCAAGGATGTGCT-3'), preferentemente de una secuencia SEQ ID NO: 2 (5'-ACCAATGAGCGAGTCATCAA-3'), o de una secuencia de SEQ ID NO: 14 (5'-AACTTGTTTCCTGCAGGTGA-3'), o de una secuencia de SEQ ID NO: 15 (5'-TGGTTCATGACAATATCGAC-3'). Preferentemente, comprende o consiste en una secuencia que comprende en el grupo seleccionado entre SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 38 y SEQ ID NO: 40, más preferentemente, en el grupo que consiste en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 14 y SEQ ID NO: 15.

**[0047]** En otro aspecto de la descripción, el ácido nucleico es un ARN de interferencia (ARNi).

**[0048]** La interferencia de ARN es un término inicialmente acuñado por Fire y sus colaboradores para describir la observación de que el ARN bicatenario (ARNbc) puede bloquear la expresión génica cuando se introduce en gusanos (Fire y col., 1998, Nature 391:806-811). ARNbc dirige el silenciamiento postranscripcional específico de un gen en muchos organismos, incluidos los vertebrados, y ha proporcionado una nueva herramienta para estudiar la función de los genes. La interferencia de ARN de participa en la degradación del ARNm, pero muchos de los mecanismos bioquímicos que subyacen en esta interferencia son desconocidos. El uso de la interferencia de ARN se ha descrito más detalladamente por Carthew y col. (2001, Current Opinions in Cell Biology, 13:244-248) y por Elbashir y col. (2001, Nature, 411:494-498). Las moléculas de ARNi descritas en esta invención son ARN bicatenario o monocatenario, preferentemente de aproximadamente 21 a aproximadamente 23 nucleótidos, que median la inhibición del ARN. Es decir, el ARNi descrito en esta invención media la degradación del ARNm que codifica TCTP.

**[0049]** El término "ARNi" incluye ARN bicatenario, ARN monocatenario, ARN aislado (ARN parcialmente purificado, ARN esencialmente puro, ARN sintético, ARN producido de forma recombinante), así como ARN alterado que difiere del ARN de origen natural por la adición, delección, sustitución y/o alteración de uno o más nucleótidos. Dichas alteraciones pueden incluir la adición de material no nucleotídico, tal como el(los) extremo(s) del ARN o internamente (en uno o más nucleótidos del ARN). Los nucleótidos en las moléculas de ARNi descrito en esta invención también pueden comprender nucleótidos no estándar, incluyendo nucleótidos o desoxirribonucleótidos de origen no natural. En conjunto, todos estos compuestos de ARNi alterado se refieren como análogos o análogos de ARN de origen natural. El ARNi descrito en esta invención solo necesita ser lo suficientemente similar al ARN natural para que tenga la capacidad de mediar en la interferencia del ARN. Como se usa en esta invención, la frase "mediar en la interferencia de ARN" se refiere a, e indica la capacidad de distinguir qué ARNm se va a ver afectado por la maquinaria o el proceso de interferencia de ARN.

El ARN que media la interferencia del ARN interactúa con la maquinaria de interferencia del ARN, de manera que dirige la maquinaria para degradar los ARNm particulares o para reducir de otro modo la expresión de la proteína diana. En un aspecto de la descripción, la presente solicitud describe moléculas de ARNi que dirigen la escisión del ARNm específico al que corresponde su secuencia. No es necesario que haya una correspondencia perfecta de las secuencias, pero la correspondencia ha de ser suficiente para permitir que el ARNi dirija la inhibición de la interferencia del ARN por escisión o falta de expresión del ARNm diana.

**[0050]** Las moléculas de ARNi descrito en esta invención pueden comprender una porción de ARN y alguna porción adicional, por ejemplo, una porción de desoxirribonucleótido. El número total de nucleótidos en la molécula de ARN es adecuadamente inferior a 49 a fin de ser mediadores eficaces de la interferencia de ARN. En las moléculas de ARN preferidas, el número de nucleótidos es de 16 a 29, más preferentemente de 18 a 23, y lo más preferentemente de 21-23.

**[0051]** Como se indicó anteriormente, el término "ARNi" incluye, entre otros, ARNips, ARNhcs, miARNs, ARNbc y otras especies de ARN que se pueden escindir *in vivo* para formar ARNips.

**[0052]** Un "ARN de interferencia corta" o "ARNip" comprende un híbrido de ARN (región bicatenaria) y puede comprender además uno o dos salientes de cadena sencilla, salientes en 3' o 5'.

65

**[0053]** Un "ARN de horquilla corta (ARNhc)" se refiere a un segmento de ARN que es complementario a una porción de un gen diana (complementario a uno o más transcritos de un gen diana), y tiene una estructura en horquilla (horquilla).

5 **[0054]** "MicroARNs" o "miARNs" son ARN codificados de manera endógena que tienen una longitud de aproximadamente 22 nucleótidos, que regulan post-transcripcionalmente los genes diana y generalmente se expresan en una forma altamente específica de tejido o etapa de desarrollo específica. Se puede diseñar y expresar miARNs artificiales según las características de los genes de miARN existentes. La arquitectura miR-30 (microARN 30) se puede usar para expresar miARNs (o ARNips) a partir de plásmidos de expresión basados en el promotor de la ARN polimerasa II (Zeng y col., 2005, *Methods enzymol.* 392:371-380). En algunos casos, las moléculas precursoras de miARN pueden incluir más de una estructura en horquilla. Las múltiples estructuras en horquilla se pueden enlazar entre sí a través de un enlazador, como, por ejemplo, un enlazador de ácido nucleico, una secuencia flanqueante de miARN, otras moléculas o alguna combinación de las mismas.

15 **[0055]** En un aspecto preferido de la descripción, el ARNi comprende o consiste en un fragmento de al menos 10, 12, 15, 18 o 20 nucleótidos consecutivos de una secuencia de SEQ ID NO: 3 (5'-AACCCGUCCGCGAUCUCCCGG-3'). Preferentemente, dicho ácido nucleico es un ARNi que comprende o consiste en una secuencia de SEQ ID NO: 3. Lo más preferentemente, dicho ácido nucleico es un ARNip o un ARNhc. La secuencia de SEQ ID NO: 3 puede modificarse, y por ejemplo corresponder a una secuencia modificada de SEQ ID NO: 3 tal como una secuencia 5'-AACCCGUCCGCGAUCUCCCGdGdG-3'.

**[0056]** Los ácidos nucleicos empleados como moléculas antisentido o ARNi pueden modificarse, preferentemente modificarse químicamente, para aumentar la estabilidad y/o la eficacia terapéutica de los ácidos nucleicos *in vivo*.

25 **[0057]** Por ejemplo, los oligonucleótidos pueden emplearse como derivados de fosforotioato (reemplazo de un átomo de oxígeno que no una fosforilo con un átomo de azufre) que tienen una resistencia incrementada a la digestión por nucleasas. La modificación de MOE (esqueleto ISIS) o modificación con lípidos (esqueleto de Philippe Barthelemy) es también eficaz.

30 **[0058]** Adicional o alternativamente, algunas nucleobases de una molécula de ARNi pueden estar presentes como desoxirribosas. Esa modificación solo debe afectar al esqueleto de la nucleobase, en el que el grupo hidroxilo está ausente, pero no a la cadena lateral de la nucleobase, que permanece sin cambios. Dicha modificación suele favorecer el reconocimiento del ARNi por el complejo DICER.

### 35 Usos terapéuticos de los antagonistas descritos en esta invención

**[0059]** Los inventores han hallado que los ARNips y los oligonucleótidos antisentido que se dirigen a la TCTP inhiben la progresión resistente a la castración de las células PC3, LNCaP y C4-2 y los xenoinjertos y potencian la sensibilidad a docetaxel y a la castración. Por lo tanto, la presente solicitud describe un antagonista de TCTP, por ejemplo, un ácido nucleico como se ha definido anteriormente, para su uso en el tratamiento o la prevención del cáncer, preferentemente un cáncer hormonoresistente y/o quimioresistente. La presente solicitud también describe un antagonista de TCTP para su uso en la restauración de la sensibilidad a la terapia con hormonas y/o quimioterapia en un paciente que padece cáncer.

45 **[0060]** La solicitud también describe un método para tratar o prevenir un cáncer y/o para restaurar la sensibilidad a la terapia hormonal y quimioterapia que comprende la etapa que consiste en administrar una cantidad eficaz de un antagonista como se describe en esta invención a un individuo en necesidad del mismo.

**[0061]** Como se usa en esta invención, el término "cáncer" se refiere a cualquier tipo de tumor maligno (es decir, no benigno). El tumor puede corresponder a un tumor maligno sólido, que incluye, por ejemplo, carcinomas, adenocarcinomas, sarcomas, melanomas malignos, mesoteliomas, blastomas o cáncer de sangre como leucemias, linfomas y mielomas. El cáncer puede corresponder, por ejemplo, a un cáncer de próstata avanzado, un cáncer de páncreas, un cáncer de vejiga, un cáncer de ovario, un cáncer de testículo, un adenoma cortical, un cáncer de colon, un cáncer colorrectal, un cáncer de mama o un cáncer de hígado.

55 **[0062]** Los cánceres que se tratan preferentemente como se describe en esta invención son aquellos en los que la TCTP se expresa a niveles más altos en células cancerosas que en células no cancerosas del mismo tipo de tejido. Ejemplos de estos cánceres incluyen, sin limitación, cáncer de próstata, cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer de mama, cáncer de hígado, eritroleucemia, gliomas, melanomas, hepatoblastomas y linfomas.

60 **[0063]** Se cree que los antagonistas descritos en esta invención son capaces de retrasar o prevenir la emergencia de un fenotipo resistente independiente de hormonas, y de ser capaces de revertir un fenotipo resistente independiente de hormonas. Por lo tanto, son particularmente adecuados para su uso en el tratamiento de un cáncer independiente de hormonas o de un cáncer dependiente de hormonas en el que se espera que ocurra la independencia hormonal. El término "castración" en la expresión "resistente a la castración" o "independencia a la

65

castración" según la invención se refiere a "hormona" y corresponde a "resistente a hormonas" o "independencia hormonal". Independencia androgénica se refiere a una independencia hormonal. De hecho, un cáncer de próstata independiente de andrógenos (CPIA) es un cáncer de próstata resistente a la castración (CPRC).

5 **[0064]** Por lo tanto, una realización preferida descrita en esta invención está dirigida a un antagonista descrito en esta invención para su uso en el tratamiento o la prevención de un cáncer independiente de hormonas o resistente a la quimioterapia.

**[0065]** Dado que los antagonistas descritos en esta invención son capaces de restaurar la sensibilidad a los fármacos, son particularmente adecuados para su uso en el tratamiento de cánceres avanzados o cánceres resistentes a la quimioterapia. Los antagonistas descritos en esta invención se pueden usar notablemente **como una terapia de segunda línea**.

**[0066]** El experto en la materia es capaz de determinar si un cáncer es un cáncer "avanzado" usando métodos de clasificación bien conocidos, como por ejemplo el grado o la clasificación TNM. Por ejemplo, se puede usar el grado (G1-4) de las células cancerosas. Más específicamente, las células cancerosas son de "bajo grado" si parecen similares a las células normales, y de "alto grado" si parecen poco diferenciadas. Por ejemplo, los cánceres G3 o G4 se clasificarían como cánceres avanzados. Adicional o alternativamente, se puede usar la clasificación TNM. En esta clasificación, T(a, es, (0), 1-4) indica el tamaño o extensión directa del tumor primario, N(0-3) indica el grado de propagación a los ganglios linfáticos regionales, y M(0/1) indica la presencia de metástasis. Por ejemplo, un cáncer T4/N3/M1 se clasificaría como un cáncer avanzado.

**[0067]** Lo más preferentemente, el cáncer es un cáncer de próstata, por ejemplo, un cáncer de próstata avanzado y/o un cáncer de próstata independiente de andrógenos. En una realización específica, los cánceres de próstata dependientes de andrógenos pueden excluirse del alcance de los cánceres a tratar descritos en esta invención.

**[0068]** Los inventores han descubierto además que los oligonucleótidos antisentido descritos en esta invención potenciaron los efectos antineoplásicos de la quimioterapia con docetaxel tanto *in vitro* como *in vivo*. En particular, se cree que los antagonistas descritos en esta invención **son capaces de revertir un fenotipo resistente a la castración y de restaurar la sensibilidad a los fármacos**. Por lo tanto, el antagonista descrito en esta invención puede usarse ventajosamente (simultánea o secuencialmente) en combinación con al menos un segundo agente antineoplásico (por ejemplo, en el marco de una quimioterapia).

35 **[0069]** En particular, el antagonista descrito en esta invención se puede usar en el marco de una quimioterapia de combinación. El antagonista descrito en esta invención puede usarse, por ejemplo, (simultánea o secuencialmente) en combinación con al menos uno de los siguientes agentes antineoplásicos:

- un agente antimetabólico tal como docetaxel, vincristina, paclitaxel (taxol), vinorelbina y abraxane;
- 40 - un fármaco de terapia hormonal, tales fármacos se usan comúnmente en el marco del tratamiento de los cánceres sensibles a las hormonas. Los fármacos de terapia hormonal incluyen, por ejemplo, tamoxifeno, agonistas y antagonistas de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), antagonista del receptor de andrógenos (RA) y antagonistas del receptor de estrógenos (RE);
- un agente alquilante tal como ciclofosfamida, clorambucil y melfalán;
- 45 - un antimetabolito tal como metotrexato, citarabina, fludarabina, 6-mercaptopurina y 5-fluorouracilo;
- un inhibidor de la topoisomerasa tal como doxorubicina, irinotecán, derivados de platino, cisplatino, carboplatino, oxaliplatino;
- un inhibidor de la aromatasas tal como bicalutamida, anastrozol, exemestano y letrozol;
- un inhibidor de la señalización tal como imatinib (Gleevec), gefitinib y erlotinib;
- 50 - un anticuerpo monoclonal tal como rituximab, trastuzumab (herceptina) y gemtuzumab ozogamicina;
- un modificador de respuesta biológica tal como interferón-alfa;
- un agente diferenciador tal como tretinoína y trióxido de arsénico; y/o
- un agente que bloquea la formación de vasos sanguíneos (agentes antiangiogénicos) como bevicizumab, serafinib y sunitinib.

55 **[0070]** Además, el método para tratar o prevenir un cáncer descrito en esta invención puede estar asociado con una radioterapia, cirugía y/o supresión de andrógenos.

**[0071]** La administración de antagonistas descritos en esta invención, y en particular de oligonucleótidos antisentido y de ARNis, puede llevarse a cabo usando diversos mecanismos conocidos en la técnica, incluyendo administración pura y administración en vehículos lipídicos farmacéuticamente aceptables o nanopartículas. Por ejemplo, los vehículos lipídicos para administración antisentido se describen en las patentes de EE.UU. n.º 5.855.911 y 5.417.978.

65 **[0072]** Pueden administrarse, por ejemplo, por vía intravenosa, intraperitoneal, subcutánea u oral, o inyección



tumoral local directa.

**[0073]** El antagonista se administra en una "cantidad eficaz", es decir, en una cantidad suficiente para tratar o prevenir el cáncer. Se apreciará que esta cantidad variará tanto con la efectividad de los oligonucleótidos antisentido u otro agente terapéutico empleado, como con la naturaleza de cualquier vehículo usado. La determinación de las cantidades apropiadas para cualquier composición dada está dentro de la experiencia en la técnica, a través de series estándar de pruebas diseñadas para evaluar los niveles terapéuticos apropiados.

**[0074]** Como se describe en esta invención, el individuo es preferentemente un individuo humano. Sin embargo, también se contempla el uso veterinario del antagonista descrito en esta invención. Por ende, el individuo también puede corresponder a un individuo no humano, preferentemente un mamífero no humano.

**[0075]** El término "tratamiento" se refiere a un método terapéutico, es decir, un método destinado a curar, mejorar la afección y/o prolongar el periodo de la vida de un individuo que padece cáncer.

**[0076]** Por "prevención" se entiende un método profiláctico, por ejemplo, con el objetivo de reducir el riesgo de recaída y/o reducir el riesgo de aparición de una independencia de hormonas.

**[0077]** El cáncer de próstata es un cáncer que sobreexpresa TCTP en cánceres avanzados, y en particular en cánceres que se han vuelto resistentes a la castración. Para el tratamiento del cáncer de próstata, los antagonistas descritos en esta invención se administran adecuadamente después de la supresión inicial de andrógenos. El inicio de la supresión de andrógenos se puede realizar mediante la castración quirúrgica (extirpación de ambos testículos) o médica (supresión de testosterona inducida por fármacos), que actualmente está indicada para el tratamiento del cáncer de próstata. La castración médica puede lograrse mediante diversos regímenes, incluidos los agentes de LHRH o antiandrógenos (véase por ejemplo Cleave y col., 1999, CMAJ 160:225-232). La terapia intermitente en la que se puede realizar la supresión reversible de andrógenos se describe en Cleave y col. (1998, Eur. Urol. 34:37-41).

**[0078]** La inhibición de TCTP, en particular de la expresión de TCTP por los ácidos nucleicos descritos en esta la invención, puede ser transitoria. Para el tratamiento del cáncer de próstata, la inhibición de la TCTP debería ocurrir idealmente junto con la supresión de andrógenos. En los seres humanos, esto significa que la inhibición de la TCTP debe ser eficaz a partir de uno o dos días de la supresión de andrógenos (antes o después) y extenderse durante aproximadamente 3 a 6 meses. Esto puede requerir múltiples dosis para llevarlo a cabo. Se apreciará, sin embargo, que el periodo de tiempo puede ser más prolongado, comenzando antes de la castración y ampliándose durante un tiempo sustancial después sin apartarse del alcance descrito en la invención.

### **Composiciones farmacéuticas descritas en esta invención**

**[0079]** La presente solicitud también describe una composición farmacéutica que comprende un antagonista descrito en esta invención, en particular un ácido nucleico descrito en esta invención como se define en el párrafo anterior, y un vehículo farmacéuticamente aceptable, así como un antagonista descrito en esta invención para su uso como un medicamento.

**[0080]** Las composiciones farmacéuticas formuladas de una manera adecuada para la administración de ácidos nucleicos son conocidas por los expertos en la materia. Por ejemplo, los vehículos lipídicos (en particular liposomas) son vehículos farmacéuticamente aceptables particularmente adecuados cuando se administra un ácido nucleico descrito en esta invención.

**[0081]** Los ejemplos no limitantes de vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados para la formulación con el ácido nucleico descrita en esta invención incluyen: ácidos nucleicos conjugados con PEG, ácidos nucleicos conjugados con fosfolípidos, ácidos nucleicos que contienen restos lipófilos, fosforotioatos, inhibidores de la glicoproteína P (tales como Pluronic P85) que pueden mejorar la entrada de fármacos en diversos tejidos, polímeros biodegradables (como microesferas de poli(DL-lactida-coglicólido)) para la administración de liberación sostenida después del implante, y nanopartículas cargadas (como las hechas de polibutirilcianoacrilato).

**[0082]** La solicitud también describe una composición farmacéutica que comprende liposomas modificados en la superficie que contienen lípidos de poli(etilenglicol) (modificados con PEG, ramificados y no ramificados o combinaciones de los mismos, o liposomas de circulación larga o liposomas sigilosos). Los ácidos nucleicos descritos en esta invención también pueden comprender moléculas de PEG unidas covalentemente de diversos pesos moleculares. Estas formulaciones ofrecen un método para aumentar la acumulación de fármacos en los tejidos diana. Esta clase de vehículos farmacológicos resiste la opsonización y la eliminación por el sistema fagocítico mononuclear (MPS o RES), lo que permite tiempos de circulación sanguínea más largos y una mayor exposición al tejido para el fármaco encapsulado (Lasic y col., 1995, Chem. Rev., 95:2601-2627; Ishiwata y col., 1995, Chem. Pharm. Bull., 43:1005-1011). Se ha demostrado que tales liposomas se acumulan selectivamente en tumores, presumiblemente por extravasación y captura en los tejidos diana neovascularizados (Lasic y col., 1995, Science, 267:1275-1276; Oku y col., 1995, Biochim. Biophys Acta, 1238:86-90). Los liposomas de circulación

prolongada mejoran la farmacocinética y la farmacodinámica del ADN y el ARN. También es probable que los liposomas de circulación prolongada protejan a los fármacos de la degradación de las nucleasas en mayor medida que los liposomas catiónicos.

5 **[0083]** La composición farmacéutica descrita en esta invención puede comprender estabilizadores, tampones y similares. Cuando se desea usar un mecanismo de administración de liposomas, pueden seguirse protocolos estándar para la formación de liposomas. Las composiciones descritas en esta invención pueden formularse y usarse como comprimidos, cápsulas o elixires para administración oral, supositorios para administración rectal, soluciones estériles o suspensiones para administración inyectable.

10

**[0084]** La elección de la formulación depende en última instancia de la forma de administración prevista, tal como por ejemplo una forma de administración intravenosa, intraperitoneal, subcutánea u oral, o una administración local mediante inyección tumoral. Preferentemente, la composición farmacéutica descrita en esta invención es una solución o suspensión, por ejemplo, una solución o suspensión inyectable. Puede, por ejemplo, envasarse en forma de dosificación unitaria.

15

**[0085]** Aunque tienen significados distintos, los términos "que comprende", "que tiene", "que contiene" y "que consiste en" pueden reemplazarse entre sí a lo largo de la descripción anterior.

20 **[0086]** Como se describe en esta invención, todos los compuestos, polipéptidos y péptidos se pueden aislar y/o purificar opcionalmente.

**[0087]** La invención se evaluará más a fondo en vista de los siguientes ejemplos y figuras.

## 25 **BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**

**[0088]**

La Figura 1 ilustra el nivel de expresión de TCTP después de la supresión de andrógenos.

30 La Figura 2 ilustra el nivel de expresión de TCTP en la regulación positiva o negativa de Hsp27.

La Figura 3 ilustra el efecto de la expresión de TCTP en la viabilidad celular de control de LNCaP y Hsp27.

La Figura 4 muestra la expresión de la proteína TCTP en células PC3 transfectadas con ARNip o OAS de TCTP.

La Figura 5 ilustra el efecto de la inhibición de TCTP sobre la viabilidad de las células PC-3.

Las Figuras 6 y 7 ilustran la tasa de células PC-3, LNCaP y C4-2 apoptóticas después de la inhibición de TCTP.

35 La Figura 8 ilustra la actividad antineoplásica de OAS de TCTP en el volumen de tumor xenoinjertado con PC3 (panel superior) y su actividad aditiva con docetaxel (panel inferior).

La Figura 9 ilustra el efecto del tratamiento con OAS de TCTP sobre el crecimiento del tumor PC-3 y la quimiosensibilidad a docetaxel *in vivo*.

40 Las Figuras 10 y 11 ilustran el efecto del tratamiento con OAS de TCTP sobre el crecimiento del tumor LNCaP *in vivo* después de la castración.

La Figura 12 ilustra el impacto de un ARNip de TCTP en la proliferación y apoptosis de las células PC3.

La Figura 13 ilustra el impacto de un OAS de TCTP en la proliferación y apoptosis de las células PC3.

La Figura 14 ilustra la semivida de TCTP después del tratamiento con cicloheximida (A) y el porcentaje de células PC-3 que van a apoptosis después del tratamiento con OAS de TCTP.

45 La Figura 15 ilustra el efecto de la inhibición de TCTP en la viabilidad de las células LNCaP y C4-2.

La Figura 16 ilustra la capacidad de los mutantes N-terminal o C-terminal de Hsp27 para interactuar con TCTP.

La Figura 17 ilustra la capacidad de los mutantes de fosforilación de Hsp27 para interactuar con TCTP.

## **BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS SECUENCIAS**

50

**[0089]**

La SEQ ID NO: 1 muestra la secuencia de la proteína TCTP humana.

55 La SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 17 a la SEQ ID NO: 40 muestran secuencias de OAS; las secuencias SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 14 y SEQ ID NO: 15 son secuencias de OAS de TCTP descritas en esta invención.

La SEQ ID NO: 3 muestra la secuencia de un ARNip de TCTP descrita en esta invención.

La SEQ ID NO: 4 muestra la secuencia de un oligonucleótido aleatorio que se ha usado como control.

60 La SEQ ID NO: 5 muestra la secuencia de un ARNm de TCTP humano. Se indican las regiones a las que se dirige por OAS de TCTP de la SEQ ID NO: 2 y por ARNip de TCTP de la SEQ ID NO: 3.

Las SEQ ID Nos. 6 a 13 muestran las secuencias de cebadores usados en los Ejemplos.

La SEQ ID NO: 16 secuencia de proteína Hsp27

## **EJEMPLOS**

65

**Ejemplo 1: Materiales y métodos**Ácidos nucleicos

5 **[0090]** La secuencia conocida de ARNm de TCTP humana (número de acceso en la base de datos de NCBI: NM-003295) sirvió como base para el diseño de oligonucleótidos antisentido (OAS) e inhibidores de nucleótidos de ARN de interferencia pequeña (ARNip). El OAS de fosforotioato fue obtenido por Eurofins MWG Operon (Alemania). Los OAS preferidos tienen las secuencias 5'-ACCAATGAGCGAGTCATCAA-3' (SEQ ID NO: 2), 5'-AACTTGTTTCCTGCAGGTGA-3' (SEQ ID NO: 14) y 5'-TGGTTCATGACAATATCGAC-3' (SEQ ID NO: 15). Se usó  
 10 un oligonucleótido aleatorio 5'-CGTGTAGGTACGGCAGATC-3' (SEQ ID NO: 4) como control. La secuencia del ARNip de TCTP fue 5'-AACCCGUCCGCGAUCUCCdGdG-3' (es decir, una secuencia de SEQ ID NO: 3 en la que las dos guanosinas C-terminales son desoxirribosas. Esta modificación solo afecta al esqueleto de la nucleobase, en el que el grupo hidroxilo está ausente, pero la cadena lateral permanece inalterada). Este ARNip y sus respectivos ARNip aleatorios validados, usados como control para los experimentos del ARNip, se obtuvieron en Qiagen  
 15 (Francia).

Estirpes celulares y condiciones de cultivo celular.

**[0091]** La estirpe celular de cáncer de próstata RC PC-3 se adquirió en la American Type Culture Collection (Rockville, MD, EE. UU.). Las células se mantuvieron en medio de Eagle modificado por Dulbecco (Invitrogen, Cergy Pontoise, Francia), suplementado con un 10 % de suero fetal bovino (FCS). Las células LNCaP de la estirpe celular del cáncer de próstata sensible a la castración humana (SC) fueron proporcionadas amablemente por la Universidad de Virginia (Charlottesville, VA, EE. UU.), la estirpe celular del cáncer de próstata humano RC C4-2 fue realizada por el Dr. Martin Gleave (The Prostate Center, Vancouver, Canadá) y la estirpe celular de próstata normal PNT2C2 fue  
 25 proporcionada amablemente por el York Cancer Research (Universidad de York, York, Reino Unido). Esas células se mantuvieron en RPMI 1640 (Invitrogen) suplementado con FCS al 10 %. Las células REG del cáncer colorrectal fueron proporcionadas amablemente por la Dra. Carmen Gamido (INSERM U-517, Facultad de Medicina y Farmacia, Dijon, Francia) y se mantuvieron en medio F10 (Invitrogen) suplementado con FCS al 10 %.

30 Infección lentiviral de Hsg27 en células LNCaP.

**[0092]** El ADNc de longitud completa para Hsp27 humana se subclonó en el vector lentiviral pHR'-CMV-EGFP en los sitios BamHI y XhoI como se describió anteriormente (Rocchi y col., 2005, Cancer Res, 65:11083-11093).  
 35

Medio de levadura con sistema de reclutamiento Sos (SRS)

**[0093]** Las células de levadura se cultivaron para la transformación en medio YPAD (levadura peptona adenina) (1 % de extracto de levadura, 2 % de bactopectona, 2 % de dextrosa, 40 mg de sulfato de adenina, 40 % de glucosa por litro). El medio de selección (pérdida) consistió en 1,7 g/l de base de nitrógeno de levadura sin aminoácidos, 5 g/l de sulfato de amonio, 20 g/l de dextrosa, aminoácidos y suplementos adicionales según lo sugerido por el fabricante (Stratagene, Palo Alto, Estados Unidos). El medio de galactosa se preparó sustituyendo glucosa con 20 g/l de galactosa y 10 g/l de rafinosa. El medio sólido se preparó añadiendo agar al 1,7 % antes de la autoclave.  
 45

Detección del sistema de reclutamiento Sos de dos híbridos de levadura (SRS).

**[0094]** Se usó el sistema de doble híbrido de levadura SRS de Stratagene (CytoTrap) para identificar los interactores de la proteína Hsp27. Para esto, la Hsp27 humana se fusionó con los residuos 1070 N-terminales de Sos humanos y se usó como cebo. Se identificó selectivamente una biblioteca de ADNc de plásmidos de testículo y una biblioteca de ADNc de HeLa de cáncer de cuello uterino, cada una de ellas construida en el vector pMyr (Stratagene) con  $4,5 \times 10^6$  colonias primarias y un tamaño de inserción promedio de 1,7 kb según las instrucciones del fabricante. Todas las transformaciones de levadura se realizaron usando el método estándar de acetato de litio. Para la detección de CytoTrap, la cepa de levadura cdc25H se cotransformó con 20 mg del plásmido de biblioteca pMyr-ADNc y 20 mg del plásmido recombinante pSos-cebo. Los transformantes ( $5 \times 10^6$ ) se identificaron selectivamente para cada proteína de cebo. Los transformantes resultantes se cultivaron durante 3 días a una temperatura permisiva (24 °C) en un medio de selección que contenía glucosa y suplementos adicionales, excluyendo leucina y uracilo (SC-Leu-Ura). Después del sembrado en placas de la réplica de galactosa mínimas selectivas, las colonias que mostraron un crecimiento bajo temperatura restrictiva (37 °C) se consideraron clones positivos. Las colonias se parchearon en medio que contenía glucosa y se cultivaron a 24 °C durante 2 días. Luego se sembraron en placas de glucosa y galactosa y se cultivaron a 37 °C. Se seleccionaron colonias que muestran crecimiento solo en galactosa y no en medio de glucosa y se confirmaron como verdaderos positivos mediante una segunda ronda de detección. Estos clones se cultivaron en medio líquido, la pared celular de la levadura se rompió mediante agitación en vórtex con perlas de vidrio (Sigma) y los plásmidos se aislaron con el kit Miniprep de Wizard Plus SV (Promega). Se usaron 5 µl de la preparación del plásmido para cada reacción de PCR usando GoTaq  
 65

(Promega) y los cebadores específicos del vector pMyr (5'-AACCCCGGATCGGACTACTA-3', SEQ ID NO: 6; 5'-AATAAGCTCTAGAGGGCCGC-3' inversa, SEQ ID NO: 7). La presencia de un solo amplicón se confirmó mediante electroforesis en gel de agarosa y la secuenciación se llevó a cabo mediante el servicio de secuenciación Genome Express (<http://www.cogenics.com/>). La identificación de las secuencias del inserto se realizó mediante búsquedas en la base de datos usando el Servicio BLAST de NCBI (Altschul y col., 1997, *Nucleic Acids Res.* 25:3389-402).

#### Análisis de membrana Western.

**[0095]** El análisis de membrana Western se realizó como se describió anteriormente (Rocchi y col., 2004, *Cancer Res.* 64:6595-602) con anticuerpo policlonal anti-Hsp27 de conejo 1:5000 (Assay Designs, Villeurbanne, Francia), anticuerpo policlonal de TCTP de conejo 1:2000 (Abcam Inc., Cambridge, Reino Unido), anticuerpo policlonal anti-MSL1v1 de conejo 1:250 (Abcam Inc.), anticuerpo monoclonal anti-ubiquitina de ratón 1:500 (Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg, Alemania) o anticuerpo policlonal anti-caspasa-3 de conejo 1:1000 (Cell Signaling Technology Inc., Danvers, EE. UU.). Los niveles de carga se normalizaron usando anti-gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa policlonal de conejo 1:5000 (Abcam Inc.) o anticuerpos monoclonales anti-vinculina de ratón 1:2500 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EE. UU.).

#### Construcción de TMA.

**[0096]** La expresión de TCTP se evaluó en 2 micromatrices de tejidos diferentes (TMA) de muestras antes y después de la terapia de castración (TC) (o terapia de hormonas, TH). La primera TMA se realizó en Marsella por S. Giusano con diferentes muestras de próstata no tratadas (n = 131) que incluyeron 20, 56, 10 y 5 adenocarcinomas de próstata (ADK) con una puntuación de Gleason de 6, 7, 8 y 9 respectivamente, 16 de tejidos normales de próstata, 6 lesiones por neoplasia intraepitelial prostática (PIN), 12 hiperplasias benignas de próstata (BPH) y 6 controles negativos (placenta). Se perforaron dos núcleos por grado de Gleason (es decir, 2, 4 o 6 núcleos por paciente) con un total de 330 núcleos. Se tomaron muestras de los núcleos usando un matrizador de tejidos (Alphelys, Plaisir, Francia). Los cilindros centrales de 0,6 mm de diámetro perforados desde el bloque donador se depositaron en el bloque de parafina del receptor. Las secciones de TMA (4 µm de espesor) se cortaron 24 horas antes del procesamiento inmunohistoquímico. La segunda TMA fue realizada por L. Fazli en Vancouver e incluyó tejidos de próstata tratados con castración (TC) o tratados con hormonas (TH) (n = 232) obtenidos del banco de tejidos en el Departamento de Patología y Laboratorio de Investigación de Próstata en el Jack Bell Research Centre en el Hospital General de Vancouver. La mayoría de los tejidos procedían de especímenes de prostatectomía radical, mientras que los tejidos RC se obtuvieron de resecciones transuretrales. Los especímenes se eligieron para representar varias duraciones del tratamiento de la terapia de supresión de andrógenos antes de la prostatectomía radical que va de la ausencia de tratamiento (n = 35), de 0 a 3 meses (n = 58), de 3 a 6 meses (n = 52) y de 6 meses (n = 57). También se identificaron tumores RC (n = 30). Este TMA se construyó usando un micromatrizador de Beecher de prostatectomía radical y muestras transuretrales (Beecher Instruments, Silver Spring, MD). Cada muestra de paciente se representó con 3 núcleos en la TMA.

#### Análisis de micromatrices de tejidos.

**[0097]** La primera TMA se analizó como se describió anteriormente (Charpin y col., 2009, *Int J Oncol* 34:983-93; Charpin y col., 2009 *Int J Cancer* 124:2124-34; Garcia y col., 2007, *Hum Pathol* 38:830-41) con anticuerpo anti-TCTP 1:100 (Abcam). Y el segundo análisis de TMA se realizó como se describió anteriormente (Rocchi y col., 2004, *Cancer Res.* 64:6595-602) con un anticuerpo anti-TCTP 1:50 (Abcam).

#### Procedimiento de análisis de imagen.

**[0098]** El análisis de imágenes se usó para la cuantificación de la inmunohistoquímica. El primer análisis de TMA con el dispositivo automatizado SAMBA 2050 (SAMBA Technologie/TRIBVN, Châtillon 92320, Francia) se realizó como se describió anteriormente (Charpin y col., 1998, *J Pathol* 184:401-7; Altman y col., 1994, *J Natl Cancer Inst* 86:829-35; Charpin y col., 2009, *Int J Oncol* 34:983-93; Charpin y col., 2009 *Int J Cancer* 124:2124-34; Garcia y col., 2007, *Hum Pathol* 38:830-41). Para la segunda TMA, se tomaron fotomicrografías a través de un microscopio Leica DMLS acoplado a una cámara digital (Photometrics CoolSNAP, Roper Scientific, Inc., Glenwood, IL) como se describió anteriormente (Rocchi y col., 2004, *Cancer Res.* 64:6595-602).

#### Inmunofluorescencia.

**[0099]** Las células de control LNCaP y Hsp27 se cultivaron en cubreobjetos de vidrio en medios RPMI y suero fetal bovino al 10 % durante 24 h. Posteriormente, las células se fijaron con paraformaldehído al 4 % frío durante 10 minutos a 25 °C y se permeabilizaron en Triton X-100 al 0,05 % en PBS. Los portaobjetos se incubaron en solución de bloqueo de albúmina de suero bovino al 1 % en PBS durante 30 minutos y se trataron con anticuerpos primarios Hsp27 monoclonal de ratón (StressGen) y policlonal TCTP de conejo (Abcam) simultáneamente durante la noche. Los anticuerpos fluorescentes secundarios de cabra anti-ratón Alexa Fluor 546 (Invitrogen) y cabra anti-conejo Alexa Fluor 488 (Invitrogen) se agregaron durante 1 hora a temperatura ambiente

con 35 minutos de lavado en PBS. Las preparaciones se montaron con medios de montaje vectashield 4,6-diamidino-2-fenilindol fluorescentes (Vector Laboratories, Clinisciences, Montrouge, Francia). Las imágenes se capturaron usando un plano de microscopio confocal de fluorescencia Zeiss 510 META 63X/1.4 (Le Pecq, Francia), seguido de un análisis de colocalización focal realizada con el software Image Proplus 6 (MediaCybernetics, Wokingham, Reino Unido) con una asignación de amarillo para focos colocalizados y verde o rojo como no colocalización.

#### Inmunoprecipitación

- 10 **[0100]** Se usaron lisados aclarados (250 µg) con concentración de proteína ajustada (ensayo de proteínas, Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, Francia) para la inmunoprecipitación (IP) con anticuerpos de conejo anti-TCTP 1:50 (Abcam) O/N a 4 °C. Los complejos inmunitarios se precipitaron después de 1 h de incubación con 30 ml de perlas de inmunoglobulina anti-conejo TrueBlot (eBiosciences, París, Francia). Después de lavar tres veces en tampón de lisis frío, los complejos se volvieron a suspender en tampón de muestra de proteína (Bio-Rad) y se hirvieron durante 15 minutos antes de realizar la membrana Western como se describió anteriormente. Se usó el anticuerpo secundario IgG anti-conejo de True Blot (Biosciences) para revelar la membrana Western.

#### Análisis de la expresión de ARNm de TCTP.

- 20 **[0101]** El análisis de la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa cuantitativa (qRT-PCR) se realizó en un sistema de detección LightCycler (Roche Applied Science, Meylan, Francia). Los niveles de expresión de la subunidad 18S del gen ribosoma se usaron como control interno. El ADNc de primera hebra se sintetizó a partir de 1 µg de ARN total usando hexámeros aleatorios y se expandió por transcriptasa inversa según las instrucciones del fabricante (Sistema de transcripción inversa ImProm-II, Promega, Charbonnières-les-Bains, Francia), posteriormente se diluyó 1:10 con agua, y se almacenó a -20 °C hasta su uso. TCTP y los productos de la reacción en cadena de la polimerasa 18S (PCR) se detectaron mediante PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR) usando la premezcla SYBR Ex Taq (Takara Bio Inc., St Germain en Laye, Francia) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se mezclaron cinco microlitros de plantilla de ADNc diluido con 10 µl de premezcla SYBR Ex Taq (incluida la polimerasa Taq, tampón de reacción, MgCl<sub>2</sub>, colorante SYBR verde I y mezcla de trifosfato de desoxinucleótido) y cebadores directos e inversos 0,4 µM, en un volumen final de 20 µl. Se usaron los siguientes cebadores: 5'-GAAAGCACAGTAATCACTGGTGT-3' directo de TCTP (SEQ ID NO: 8) y 5'-GCAGCCCCTGTCATAAAAGGT-3' inverso de TCTP; (SEQ ID NO: 9); 5'-CTACCACATCCAAGGAAGGC-3' directo de 18S (SEQ ID NO: 10) y 5'-TTTTCGTCACTACCTCCCG-3' inverso de 18S (SEQ ID NO: 11). Después de una activación inicial de Taq durante 10 segundos a 95 °C, se realizó PCR Light Cycler usando 55 ciclos con las siguientes condiciones de ciclado: 95 °C durante 5 segundos, 58 °C durante 7 segundos y 72 °C durante 14 segundos. Cada muestra se analizó por duplicado y el experimento se repitió tres veces. Los resultados se analizaron usando el software de análisis de datos RealQuant (Roche, Neuilly-sur-seine, Francia). El análisis de los resultados se realizó con el método 2(-Delta Delta C(T)) (Livak K J. y col., 2001; Methods. 25:402-8).
- 40 Oligonucleótidos antisentido (OAS) y secuencias de ARN de interferencia corta (ARNip).

- [0102]** OAS 2'-O-(2-metoxietil), OGX-427, se obtuvo de OncoGenex. La secuencia de OGX-427 corresponde al sitio de inicio de la traducción de Hsp27 humana (5'-GGGACGCGG-CGCTCGGTCAT-3') (SEQ ID NO: 12). Se usó un OAS apareado (OAS; 5'-CAGCAGCAGAGTATTTATCAT-3') (SEQ ID NO: 13) como control. El AOS fosforitoato de TCTP que se dirige a la TCTP humana (5'-ACCAATGAGCGAGTCATCAA-3') (SEQ ID NO: 2) y el oligonucleótido de control (5'-CGTGTAGGTACGGCAGATC-3') (SEQ ID NO: 4) se adquirieron en Operon (Eurofin MWG, Courtaboeuf, Francia) y TCTP de OAS diseñado u OAS aleatorio. El ARNip de TCTP (5'-AACCCGUCCGCGAUCUCCdGdG-3') (es decir, una secuencia de SEQ ID NO: 3 en la que las dos guaninas C-terminales son desoxirribosas. Esta modificación solo afecta al esqueleto de la nucleobase, en la que el grupo hidroxilo está ausente, pero la cadena lateral permanece inalterada) se validó y se compró en Qiagen (Courtaboeuf, Francia). El ARNip de control también fue de Qiagen.

#### Tratamiento de las células con OAS y ARNip.

- 55 **[0103]** Las células se sembraron en placas a una densidad de 25.000 (PC-3) y 75.000 (LNCaP y C4-2) en 1,9 cm<sup>2</sup> y se trataron el día después con el ARNip u OAS indicado durante 1 o 2 días respectivamente. La oligofectamina, un lípido catiónico (Invitrogen), se usó para aumentar la captación de ARNip u OAS en las células. Las células se trataron con las concentraciones indicadas de ARNip u OAS después de una preincubación durante 20 minutos con 3 mg/ml de oligofectamina en OPTI-MEM sin suero (Invitrogen). Cuatro horas más tarde, se añadió 1 ml de FCS en el medio. Para estudiar los efectos sobre las tasas de degradación del proteasoma de TCTP, se agregaron cicloheximida (10 µg/ml) y MG132 (10 µmol/l) al final de la segunda transfección con OAS en medio reemplazado durante 24, 48 y 72 h.

#### Transfección transitoria de TCTP en células C4-2 y LNCaP.

65

**[0104]** Las células se transfectaron el día después de la siembra con el vector pcDNA 3.2/V5-DEST (Invitrogen) que contenía TCTP ts (pDEST-TCTP) o un vector de control vacío (pDEST-control). El reactivo de transfección FuGENE HD (Promega) se usó para transfectar el ADN en las células C4-2 y LNCaP. El ADN se diluyó en OPTI-MEM libre de suero (Invitrogen) a 0,02 µg/µl y se añadió el reactivo FuGENE HD usando la relación 7:2.

5 Después de 30 minutos de incubación a temperatura ambiente, el complejo de transfección se añadió a las células gota a gota.

#### Ensayo mitogénico *in vitro*.

- 10 **[0105]** Se evaluaron los efectos *in vitro* de la regulación negativa de Hsp27 y TCTP, especialmente usando regulación positiva de ARNip u OAS o TCTP en la apoptosis inducida por docetaxel y supresión de andrógenos, usando el ensayo de cristal violeta para LNCaP o C4-2 y el ensayo de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol de 2-il)-2,5-difenil tetrazolio (MTT) para PC-3 como se describió anteriormente (Rocchi y col., 2004, Cancer Res. 64:6595-602; Gleave y col., 1999, Clin Cancer Res 5:2891-8). En resumen, las células se sembraron en cada pocillo de placas de microtitulación de 12 pocillos (30.000 a 50.000 células por pocillo) y se dejaron unir durante la noche. Para estudiar el efecto de la regulación negativa de la TCTP sobre la apoptosis inducida por docetaxel, las células PC-3 se transfectaron transitoriamente el día después de la siembra con 5 nM de ARNip de TCTP durante 48 horas o 100 nM de OAS de TCTP durante 72 horas. Luego se trataron las células con 50 nM de docetaxel y se realizaron ensayos de MTT después de 24 h. Para evaluar el efecto de la regulación negativa de TCTP en la citoprotección de Hsp27, 20 las células de control LNCaP y -Hsp27 se transfectaron transitoriamente el día después de la siembra con 5 nM de ARNip de TCTP durante 48 h. La regulación negativa o positiva del efecto de TCTP en la viabilidad de las células LNCaP y C4-2 se realizó después de las transfecciones transitorias con 100 nM de OAS de TCTP o 0,02 µg/µl de pDEST-TCTP durante 72 h y 48 h, respectivamente. Las células se trataron luego con 1 nM de docetaxel en medios sin suero (imita la supresión de andrógenos *in vitro*) y los ensayos de cristal violeta se realizaron al día siguiente. 25 Cada ensayo se realizó por triplicado.

#### Análisis citométrico de flujo.

- 30 **[0106]** La citometría de flujo de los núcleos teñidos con yoduro de propidio se realizó como se describió anteriormente (Rocchi y col., 2004, Cancer Res. 64:6595-602). En resumen, las células PC-3 se sembraron en placas a la densidad de 10<sup>6</sup> células en placas de 10 cm en DMEM suplementado con 10 % de FCS. Para evaluar el efecto de la inhibición de la TCTP sobre la apoptosis y el ciclo celular, las células se trataron el día después de la siembra con 5 nM de TCTP de ARNip o control y 100 nM de TCTP de OAS o control aleatorio durante 48 h. Las células se trataron luego con 50 nM de docetaxel. Después de 24 h, las células se analizaron para determinar el 35 contenido relativo de ADN en un citómetro de flujo de láser dual (FACSCalibur, Becton Dickinson Biosciences, Le Pont de Claix, Francia). Cada ensayo se realizó por triplicado.

#### Ensayo de viabilidad por Cell Countess.

- 40 **[0107]** Las células PC-3 se trataron con 70, 100 o 200 nM de OAS de TCTP o control. 3 días después, las células se recolectaron, se combinaron con 10 µl de azul de tripano y se contaron con Countess de Invitrogen. La viabilidad, la concentración celular y el tamaño se registraron para cada muestra siguiendo las instrucciones del fabricante.

- 45 Evaluación del crecimiento de tumores *in vivo*.

- [0108]** Aproximadamente 3,10<sup>6</sup> células PC-3 y 10,10<sup>6</sup> células LNCaP se inocularon por vía subcutánea con 0,1 ml de medio de Eagle modificado por Dulbecco (Invitrogen) suplementado con FCS al 10 % para PC-3 o con 0,1 ml de Matrigel (BD Biosciences Discovery Labware) para LNCaP en la región del flanco de ratones desnudos atímicos macho de 4 semanas de edad (Charles River, L'Arbresle, Francia) a través de una aguja de calibre 23. Cuando los tumores de PC-3 alcanzaron 50 mm<sup>3</sup>, generalmente 3 a 4 semanas después de la inyección, los ratones se seleccionaron al azar para el tratamiento con OAS de TCTP solo, OAS aleatorio solo, OAS de TCTP más docetaxel u OAS aleatorio más docetaxel. Los ratones que tenían tumores LNCaP de entre 200 y 300 mm<sup>3</sup> de volumen se castraron mediante abordaje escrotal y se asignaron al azar a un brazo de tratamiento. Los ratones se 55 trataron comenzando 1 semana después de la castración con OAS de TCTP u OAS de control solo y las mediciones de PSA en suero se realizaron semanalmente. Para ambos experimentos, cada grupo experimental consistió en 10 ratones y las mediciones del volumen tumoral se realizaron una vez a la semana y se calcularon por la fórmula longitud x ancho x profundidad x 0,5236 (Gleave y col., 1999, Clin Cancer Res 5: 2891-8). Después de la asignación al azar, se inyectaron 10 mg/kg de TCTP u OAS aleatorio por vía intraperitoneal (i.p) una vez al día durante 60 días 60 para los grupos de monoterapia con OAS y 90 días para los grupos de OAS más docetaxel. Se administró un total de 35 mg/kg de docetaxel i.p. Tres veces por semana desde los días 7 a 14. Las mediciones del volumen tumoral se realizaron una vez a la semana y se calcularon por la fórmula longitud x ancho x profundidad x 0,5236 (20). Los puntos de datos se expresaron como niveles de volumen tumoral promedio +/- error estándar (EE). Todos los procedimientos con animales se realizaron de acuerdo con los protocolos aprobados por las leyes francesas y las 65 directivas europeas y con la certificación institucional adecuada.

Agentes quimioterapéuticos y químicos.

**[0109]** El docetaxel se obtuvo de Sanofi-aventis (París, Francia) y la solución madre de docetaxel se preparó con DMSO a las concentraciones requeridas antes de cada experimento. La cicloheximida y MG132 se adquirieron en Calbiochem (Merck Chemicals Ltd, Nottingham, Reino Unido).

Análisis estadístico.

**10 [0110]** Todos los resultados se expresaron como media  $\pm$  error estándar (EE). El análisis estadístico se realizó usando un análisis de varianza unidireccional seguido de la prueba de la mínima diferencia significativa protegida de Fisher (Statview 512, Brain Power Inc., Calabases, CA, EE. UU.). \*  $P \leq 0,05$  fue considerado significativo, con \*\*  $P \leq 0,01$  y \*\*\*  $P \leq 0,001$ .

**15 Ejemplo 2: TCTP es un nuevo socio de Hsp27 que está sobreexpresado en el cáncer de próstata resistente a la castración (CPRC).**

**[0111]** Para encontrar una explicación mecánica para el papel protector de Hsp27 e identificar nuevos socios de Hsp27 específicos para CPRC, se usó el enfoque CytoTrap para buscar proteínas asociadas a Hsp27. Después del análisis de PubMed de las proteínas asociadas identificadas, se prestó atención específicamente en 4 asociados: homólogo letal-1 específico para el hombre (MSL-1), proteína tumoral controlada traduccionalmente (TCTP), ribonucleoproteína nuclear heterogénea A2/B1 (hnRNP2B1) y proteína de unión al calcio S100 A4 (S100A4). El nivel de expresión de estos cuatro socios se realizó luego en líneas celulares LNCaP normales (PNT2C2), sensibles a la castración (C) y en líneas celulares PC-3 y C4-2 resistentes a la castración (RC) y en tejidos humanos. Se extrajeron las proteínas de las células normales (PNT2C2), LNCaP SC y PC-3 y C4-2 RC. Los niveles de proteína TCTP y gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) se analizaron mediante inmunoelectrotransferencia. Los resultados muestran que, si bien la TCTP se expresó solo ligeramente en las células normales PNT2C2, su expresión aumentó fuertemente en las células LNCaP SC e incluso más en las células PC-3 y C4-2 RC. Se descubrió que ni hnRNP2B1 ni S100A4 se expresaron en exceso en la estirpe de células PC-3 RC.

**30 [0112]** También se descubrió que Msl-1 se expresa ligeramente en las células normales PNT2C2, aumenta en las células LNCaP y se vuelve más alta en las células PC-3 RC. Sin embargo, en muestras humanas, Msl-1 se expresó uniformemente en muestras normales y de PC.

**35 [0113]** Para investigar las variaciones de los niveles de TCTP después de la castración en el xenoinjerto de PC, se inocularon  $10 \cdot 10^6$  células LNCaP SC en ratones desnudos atímicos y cuando los tumores tenían un volumen de entre 200 y 300 mm<sup>3</sup>, los ratones se castraron mediante un abordaje escrotal. Los tumores fueron recogidos 0 y 40 días después de la castración. En paralelo, se inocularon  $10 \cdot 10^6$  células C4-2 RC en ratones desnudos atímicos y los tumores se recogieron 60 días después de la inoculación. Se extrajeron proteínas de los tumores LNCaP y C4-2. Los niveles de proteína TCTP, Hsp27 y vinculina se analizaron mediante análisis de membrana Western. La intensidad de las bandas para TCTP y Hsp27 se normalizaron con vinculina y se puntuaron con el software Image J.

**45 [0114]** Los niveles de proteína TCTP aumentan significativamente en el xenoinjerto C4-2 RC (70 %, \*\*  $P \leq 0,01$ ) en comparación con el xenoinjerto LNCaP SC (Fig. 1A). Además, la Fig. 1B muestra un aumento del 100 % (\*\*\*,  $P \leq 0,001$ ) de la expresión de TCTP en el xenoinjerto LNCaP RC recogido 40 días después de la castración en comparación con los tumores SC.

**[0115]** Acto seguido se examinó la expresión de TCTP en muestras humanas usando micromatrices de tejido (TMA) de 131 especímenes no tratados (véase materiales y métodos). Se descubrió que la TCTP estaba sobreexpresada en el 10 % del adenocarcinoma de próstata (ADK). No se encontró expresión alguna en la hiperplasia benigna de próstata (BPH). Se descubrió que incluso en las glándulas normales diseminadas dentro de los tumores, no se observó expresión de TCTP. Con el fin de ver la expresión de TCTP durante la progresión de RC, se observó la expresión de TCTP en TMA de 232 especímenes tratados con castración (TC) (véase materiales y métodos). Se descubrió que la expresión de TCTP estaba regulada negativamente después de que la supresión de andrógenos se volviera de manera uniforme altamente expresada en metástasis RC. Los especímenes se clasificaron de 0 a +3 de intensidad, lo que representa el intervalo de la ausencia de tinción a la tinción intensa mediante puntuación visual y el análisis de imagen cuantitativo automatizado mediante el software de imágenes Proplus. Los datos de 232 muestras se usaron para calcular (promedio) la media  $\pm$  EE. Todas las comparaciones de las intensidades de tinción se realizaron a 200X aumentos. La intensidad media de las células positivas en los no tratados, <3 meses, 3 a 6 meses, >6 meses de TC, y RC fue de 1,8, 1,02, 0,8, 1,25 y 2,5, respectivamente (Fig. 1C).

**Ejemplo 3: Hsp27 protege la TCTP de la degradación de ubiquitina-proteasoma.**

**[0116]** Usando microscopía confocal, se descubrió que la TCTP se localiza conjuntamente con Hsp27 en el citoplasma de las células de control LNCaP y Hsp27 y que la intensidad de la tinción de la TCTP y la co-localización

con Hsp27 fue mayor en las células LNCaP-Hsp27 en comparación con las células transfectadas con control. Usando la co-inmunoprecipitación (co-IP), se confirmó la interacción entre la proteína Hsp27 y TCTP mediante el uso de lisados celulares de control LNCaP y Hsp27 y anticuerpos anti-TCTP de conejo o anti-inmunoglobulina (IgG) de conejo.

5

**[0117]** Con el fin de comprender el papel funcional de la interacción entre Hsp27 y TCTP, se reguló positiva y negativamente Hsp27 y se verificó el nivel de TCTP por membrana Western. Se descubrió que cuando Hsp27 se sobreexpresa, el nivel de proteína de TCTP es 30 % más alto, mientras que las células LNCaP tratadas con OGX-427 muestran un nivel de proteína de TCTP 70 % más bajo que la LNCaP tratada con el control OGX-427 (fig. 2, panel superior) sin ningún cambio en su nivel de expresión de ARNm (fig. 2, panel inferior).

10

**[0118]** Los resultados indican que el nivel de TCTP se correlaciona con el de Hsp27 y los hallazgos recientes sugieren que la Hsp27 podría afectar los niveles de sus proteínas asociadas al protegerlas de su degradación por la vía de la ubiquitina-proteasoma (Andrieu y col., 2010, *Oncogene*. 29:1883-96).

15

**[0119]** Para esclarecer cómo Hsp27 regula los niveles de la proteína TCTP, se probó el efecto de Hsp27 en las tasas de ubiquitinación de TCTP. Por ende, los niveles ubiquitinados de TCTP se determinaron usando co-inmunoprecipitación en células de control LNCaP y LNCaP-Hsp27. Se descubrió que la sobreexpresión de Hsp27 disminuía los niveles de TCTP ubiquitinados, como lo demuestra la escala de especies de alto peso molecular, que es una característica de la proteína poliubiquitinada, lo que sugiere que Hsp27 protege a la TCTP de su degradación por la vía de la ubiquitina-proteasoma.

20

**[0120]** Para determinar si la ubiquitinación de TCTP resulta en su degradación proteasomal, se determinó la semivida de TCTP después del tratamiento con OGX-427, en presencia o ausencia del inhibidor de proteasoma MG132 y el inhibidor de la síntesis de proteína cicloheximida después de 2 días. Los lisados de células PC-3, con o sin MG132 (10  $\mu\text{mol/l}$ ) o cicloheximida (10  $\mu\text{g/ml}$ ), se analizaron mediante membrana de western, lo que demuestra que el tratamiento con MG132 prolongó la semivida de la TCTP e invirtió el efecto de OGX 427. Este resultado demuestra que la regulación negativa de Hsp27 induce una disminución en el nivel de proteína TCTP a través de su degradación proteasomal.

25

**[0121]** Estos resultados están respaldados por el hecho de que después del tratamiento con cicloheximida solo (20  $\mu\text{g/ml}$ ), los niveles de proteína TCTP disminuyen el tiempo de forma dependiente en un 40 % y 60 % a las 24 horas y 48 horas respectivamente. De hecho, estos resultados se observan en la Figura 14A que muestra la señal de TCTP (normalizada con vinculina y puntuación con el software Image J) de un análisis de inmunoelectrotransferencia de lisados celulares de células PC-3 después de 24 horas y 48 horas de tratamiento con 20  $\mu\text{g/ml}$  de cicloheximida.

30

#### **Ejemplo 4: El ARNip de TCTP disminuye los efectos citoprotectores de la Hsp27.**

**[0122]** Para estudiar el papel funcional de TCTP en CPRC, se usó la inhibición inducida por ARNip de la expresión de TCTP para determinar si la reducción de la expresión de TCTP afecta el crecimiento de células de control LNCaP y Hsp27 después de la supresión de andrógenos y el tratamiento con docetaxel-quimioterapia *in vitro* combinado. La citoprotección inducida por la sobreexpresión de Hsp27 en células LNCaP parece implicar actividad de TCTP, ya que la disminución de la expresión de TCTP usando ARNip 5 nM revirtió la citoprotección a la supresión de andrógenos y el tratamiento con docetaxel normalmente conferido por la sobreexpresión de Hsp27.

45

**[0123]** Con el fin de estudiar las consecuencias de la inhibición de la TCTP en la supervivencia celular después de la supresión de andrógenos y el tratamiento con docetaxel-quimioterapia combinada, se determinó la viabilidad celular de control LNCaP y Hsp27 usando un cristal violeta después del tratamiento de 24 h con 1 nM de docetaxel en medio sin suero (imita la supresión de andrógenos *in vitro*). Este análisis demuestra que la inhibición de la TCTP disminuye la supervivencia de las células de control LNCaP y Hsp27 después de la supresión de andrógenos y el tratamiento con docetaxel-quimioterapia combinado. De hecho, la Fig. 3 muestra una reducción del 50 % (\*\*\*,  $P \leq 0,001$ ) en la tasa de crecimiento de células LNCaP-Hsp27 versus 40 % (\*\*\*,  $P \leq 0,001$ ) en control LNCaP después de la regulación negativa de TCTP (ARNip 5 nM) en comparación con el control. Después del ARNip de TCTP más docetaxel en un tratamiento con medio sin suero (imita la supresión de andrógenos *in vitro*), se descubrió una reducción del 80 % (\*\*,  $P \leq 0,01$ ) en la tasa de crecimiento de células LNCaP-Hsp27 versus una reducción del 50 % (\*\*,  $P \leq 0,01$ ) en control LNCaP en comparación con el control.

55

#### **Ejemplo 5: Detección de secuencias de OAS**

60

**[0124]** Con el fin de encontrar una secuencia OAS que tenga un efecto inhibitorio sobre la expresión de TCTP, se han diseñado 30 secuencias de OAS, 26 de las cuales se muestran en la tabla 1. Dichas 30 secuencias cubren el ARNm de TCTP (número de acceso NM 003295). Usando el programa BLAST, se ha estudiado la especificidad de dichas secuencias. Entre dichas 30 secuencias, solo se han identificado 15 secuencias como específicas para la secuencia de ARNm de TCTP (véase la tabla 1). El efecto de dichas secuencias de OAS en la expresión de TCTP

65



se probó mediante análisis de membrana Western (WB) y/o mediante reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa cuantitativa (qRT-PCR) en células PC-3 que expresan en exceso TCTP. WB y qRT-PCR se realizaron como se expone en el ejemplo 1.

5

Tabla 1:

N.º de OAS	Secuencias	Número de secuencia SEQ ID NO:	Especificidad
4	TAATCATGATGGCGACTGAA	17	sí
5	GCTGATGAGGTCCCGGTAGA	18	no
6	TCGGAGAACATCTCATCGTG	19	no
7	CAGGCACAACCCGTCCGCGA	20	no
8	ACCATCTTCCCCTCCACCTC	21	no
9	TGTTACCTTCTGTCCCTACTG	22	sí
<b>10</b>	<b>ACCAATGAGCGAGTCATCAA</b>	<b>2</b>	<b>sí</b>
11	CCTTCAGCGGAGGCATTTCC	23	no
12	CAGTACCTTCGCCCTCGGGG	24	no
13	ACCAGTGATTACTGTGCTTT	25	sí
<b>14</b>	<b>TGGTTCATGACAATATCGAC</b>	<b>15</b>	<b>sí</b>
<b>15</b>	<b>AACTTGTTTCCTGCAGGTGA</b>	<b>14</b>	<b>sí</b>
16	CTTGTAGGCTTCTTTTGTGA	26	sí
17	ATGTAATCTTTGATGACTT	27	sí
18	GTTTCCCTTTGATTGATTC	28	sí
19	TTCTGGTCTCTGTTCTTCAA	29	sí
20	ATAAAGAACTGGTAGTTTT	30	no
21	CTGGATTCATGTTTTACCA	31	no
22	CAATAGAGCAACCATGCCAT	32	no
23	ACACCATCCTCACGGTAGTC	33	no
24	AGAAAATCATATATGGGGTC	34	sí
25	CATTTCTAAACCATCCTTAA	35	sí
26	TAACATTTCTCCATTTCTA	36	sí
27	TCTCCCGGATCTTGTAGATG	37	no
28	GTCATAAAAGGTTTTACTCT	38	sí
29	TGATTTGTTCTGCAGCCCCT	39	no
30	GAAATTAGCAAGGATGTGCT	40	sí

**[0125]** Las secuencias OAS ASO4 de la secuencia SEQ ID NO: 17, ASO10 de la secuencia SEQ ID NO: 2, ASO13 de la secuencia SEQ ID NO: 25, ASO14 de la secuencia SEQ ID NO:15, ASO15 de la secuencia SEQ ID NO: 14, ASO 16 de la secuencia SEQ ID NO: 26, ASO17 de la secuencia SEQ ID NO: 27, ASO18 de la SEQ ID NO: 28, ASO 19 de la secuencia SEQ ID NO: 29, ASO24 de la secuencia SEQ ID NO: 34, ASO26 de la secuencia SEQ ID NO: 36, ASO28 de la secuencia SEQ ID NO: 38 y ASO30 de la secuencia SEQ ID NO: 40 muestran una gran capacidad para inhibir la expresión de TCTP. Y la secuencia de ASO10 que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 2 (5'-ACCAATGAGCGAGTCATCAA-3'), la secuencia de ASO15 que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 14 (5'-AACTTGTTTCCTGCAGGTGA-3'), y la secuencia de ASO14 que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 15 (5'-TGGTTCATGACAATATCGAC-3') manifiestan la mejor capacidad para inhibir específicamente la expresión de TCTP (véase la tabla 1).

**Ejemplo 6: El tratamiento con OAS y ARNip de TCTP inhibe el crecimiento celular de PC-3 RC y mejora la quimioterapia *in vitro*.**

20

**[0126]** Los estudios han demostrado que la TCTP está altamente expresada en varios cánceres como el colon (Chung y col., 2000, Cancer Lett. 156:185-190), mama (Deng y col., Genomics Proteomics Bioinformatics. 2006, 4:165-72) o tumores de próstata (Tuynder y col., 2002, Proc Natl Acad Sci USA 99:14976-14981; Arcuri y col., 2004, Prostate 60:130-140). En los modelos biológicos de reversión tumoral establecidos a partir de estirpes celulares de leucemia y cáncer de mama humanos, se descubrió que la TCTP es la regla notablemente de forma negativa la reversión tumoral (Tuynder y col., 2002, Proc Natl Acad Sci USA 99:14976-14981). Además, Tuynder y col. demostraron que la inhibición de la expresión de TCTP podría inducir cambios en el fenotipo maligno, cuando las células NIH3T3 transformadas con sarcoma viral (v-src) se transfectaron con TCTP antisentido (Tuynder y col., 2004, Proc. Natl Acad Sci. U.S.A. 101: 15364-15369).

30

**[0127]** Para determinar si la inhibición de la expresión de TCTP afecta la progresión de RC *in vitro*, la inhibición de la expresión de TCTP inducida por OAS o ARNip se determinó mediante análisis de membrana Western. Las proteínas se extrajeron de células PC-3 tratadas con 5 a 50 nM de TCTP de ARNip o 50 a 100 nM de TCTP OAS u OAS aleatorio, lo que demuestra que se observó una inhibición significativa de la proteína TCTP

después del tratamiento con ARNip u OAS a 5 y 100 nM respectivamente. Se observaron resultados similares para los niveles de ARNm de TCTP (Fig. 4). El ARNm de TCTP se obtuvo a partir de células PC-3 tratadas durante 1 día con 5 nM de TCTP o ARNip de control, y durante 2 días con 100 nM de TCTP de OAS o un control de OAS. El ARN total se extrajo y los niveles de TCTP se analizaron mediante qRT-PCR. Después de la normalización del ARNm de TCTP con niveles de ARNr 18S, los resultados se analizaron con el método 2<sup>-</sup>(Delta Delta C(T)) (Fig. 5A). Cada muestra fue analizada por triplicado. \*\* difiere de la PC-3 transfectada con ARNip de control ( $P \leq 0,01$ ) y \*\*\* con control de OAS ( $P \leq 0,001$ ) usando el software Statview.

**[0128]** Para evaluar el efecto de la regulación negativa de TCTP en el crecimiento de células RC, las células PC-3 se trataron durante 1 día con ARNip de TCTP 5 nM o durante 2 días con OAS de TCTP 100 nM. Al final del tratamiento, las células PC-3 se incubaron con 50 nM de docetaxel. Las tasas de crecimiento de las células PC-3 se examinaron usando el ensayo de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio. La Fig. 5B, muestra una reducción del 55 % (\*\*\*,  $P \leq 0,001$ ) en el crecimiento de células PC-3 4 días después del tratamiento con ARNip de TCTP 5 nM solo en comparación con el control aleatorio. Se observó una inhibición de crecimiento similar con OAS de TCTP 100 nM (Fig. 5C). El efecto de la inhibición de TCTP sobre la supervivencia celular se analizó en PC-3 después de un tratamiento combinado con OAS y docetaxel-quimioterapia. Después de 24 h de tratamiento con 50 nM de docetaxel, se determinó la viabilidad celular usando un ensayo MTT. El experimento se repitió por triplicado. \*\*\* difiere de la PC-3 transfectada con ARNip de control ( $P \leq 0,001$ ) usando el software Statview. Además, la Fig. 5C, también muestra que la regulación negativa de TCTP mediante el tratamiento con OAS puede mejorar la sensibilidad del docetaxel hasta en un 25 %. Se ha observado el mismo efecto con el ARNip de TCTP (SEQ ID NO: 3) y OAS 5'-AACTTGTTTCTGCAGGTGA-3' (SEQ ID NO: 14) y 5'-TGGTTCATGACAATATATACGAC-3' (SEQ ID NO: 15).

**[0129]** Finalmente, para evaluar si OAS de TCTP tiene el mismo efecto en las estirpes celulares de cáncer de próstata que expresan el receptor de andrógenos (RA), se usó un colorante de cristal violeta para examinar el crecimiento de células LNCaP y C4-2. LNCaP y C4-2 se trataron con TCTP 100 nM u OAS de control (Fig. 15A y B) durante 2 días. Luego, las células LNCaP y C4-2 se incubaron con 1 nM de docetaxel en medios sin suero. Este resultado muestra claramente que la regulación negativa de TCTP disminuye considerablemente el crecimiento de las células LNCaP y C4-2 y mejora la sensibilidad a los tratamientos (docetaxel y supresión de andrógenos).

#### **Ejemplo 7: El tratamiento con OAS de TCTP y ARNip induce apoptosis en células PC-3 *in vitro*.**

**[0130]** La inducción de la apoptosis y el bloqueo del ciclo celular por OAS o ARNip de TCTP se demostraron mediante citometría de flujo. La citometría de flujo se usó para cuantificar el porcentaje de células en cada fase del ciclo celular tres días después del tratamiento con ARNip. Después del tratamiento de células PC-3 con ARNip de TCTP 5 nM durante 1 día, la fracción de células sometidas a apoptosis (fracción sub-G1/G0) fue un 25 % mayor después del tratamiento con ARNip de TCTP 5 nM en comparación con el ARNip de control aleatorio (\*\*,  $P \leq 0,01$ ; Fig. 6, panel superior). Usando el tratamiento con OAS de TCTP solo, se encontró un aumento del 75 % en la fracción sub-G0G1 (\*\*\*,  $P \leq 0,001$ ; Fig. 6, panel central e inferior), mejorado por el tratamiento con docetaxel 50 nM (90 % en la fracción subgrupo G0-G1, \*\*\*,  $P \leq 0,001$ ). También se encontró que la inhibición de TCTP disminuyó el número de células en la fase S. La fracción de PC-3 en la fase S fue un 20 a 40 % menor después de los tratamientos con ARNip u OAS de TCTP, respectivamente, en comparación con los controles aleatorios (Fig. 6). Estos resultados demuestran claramente un aumento de la tasa de apoptosis y una detención del ciclo celular asociada con el silenciamiento de TCTP. Se observó que el tratamiento con docetaxel aumentó la fracción de células que experimentaban apoptosis sin cambiar la fracción de células en la fase S. La tasa de células PC-3 apoptóticas después del silenciamiento de TCTP con diferentes concentraciones de OAS se exploró con countess de Invitrogen (Fig. 6 y Fig. 7A). Las células PC-3 se trataron con 70, 100 o 200 nM de OAS de TCTP o control. Las células se recogieron 3 días después del tratamiento y se agregaron 10 ml de azul de tripano antes del análisis con Countess de Invitrogen. Los resultados mostraron que tres días después de la transfección de PC-3 con 70, 100 y 200 nM de TCTP u OAS de control aleatorio, la tasa de células apoptóticas fue de 100, 200 y 300 %, respectivamente. Se observaron los mismos efectos con ARNip de TCTP. Además, se ha notificado que TCTP interactúa con la caspasa-3, inhibiendo así la activación de la caspasa-3 (Gnanasekar y col., 2009, Int J. Oncol. 34:1241-6). Con el fin de investigar el efecto del silenciamiento de TCTP en la escisión y la actividad de la caspasa-3, las células PC-3 se trataron diariamente con TCTP 100 nM u OAS aleatorios durante 2 días. Las células se recogieron 2 días después y las proteínas se extrajeron para la inmunoelectrotransferencia con un anticuerpo de caspasa-3 que reconoce tanto la caspasa-3 escindida como la de longitud completa. La membrana Western revela la presencia de fragmentos de caspasa-3 escindidos activos (17-20 kDa) solo en células PC-3 tratadas con OAS de TCTP o ARNip de TCTP, pero no en las células tratadas de control.

#### **Ejemplo 8: La sobreexpresión de TCTP confiere quimiorresistencia en células LNCaP y C4-2.**

**[0131]** Para abordar mejor el papel de TCTP en la quimiosensibilidad, las células C4-2 y LNCaP se transfectaron transitoriamente con vectores de control pDEST-TCTP o pDEST. Después de 48 h de tratamiento con 1 nM de docetaxel en medio sin suero (que simula la supresión de andrógenos *in vitro*), se determinó la viabilidad celular usando el ensayo de cristal violeta. Los resultados obtenidos indican claramente que las células LNCaP y C4-

2 que sobreexpresan TCTP aumentaron la supervivencia celular después de la supresión de andrógenos y el tratamiento con docetaxel-quimioterapia combinado. De hecho, la TCTP claramente parece tener un papel en la quimiosensibilidad celular ya que su sobreexpresión conduce a un aumento del 40 % (\*\*,  $P \leq 0,01$ ) y del 60 % (\*\*\*,  $P \leq 0,001$ ) en la viabilidad de LNCaP y C4-2 respectivamente (Fig. 7B y Fig. 7C) después de docetaxel 1 nM en un  
5 tratamiento con medio sin suero.

**Ejemplo 9: El tratamiento con OAS de TCTP inhibe la progresión del tumor PC-3 y mejora la quimioterapia *in vivo*.**

10 **[0132]** A continuación, se evaluó los efectos del tratamiento con OAS de TCTP sobre el crecimiento de tumores PC-3 *in vivo* (Fig. 8). Se seleccionaron aleatoriamente ratones macho desnudos que tenían tumores PC-3 (50 mm<sup>3</sup>) para OAS de TCTP versus OAS aleatorio y se administraron 10 mg/kg de OAS una vez al día por inyección i.p. durante 70 días. Desde los días 7 a 14, se administraron i.p. 30 mg/kg de docetaxel 3 días en la semana. El volumen medio del tumor fue similar en todos los grupos antes de la terapia.

15 **[0133]** La Figura 8, panel superior (*Puntos*, volumen medio tumoral en cada grupo experimental que contiene 10 ratones; *barras*, EE. \*, \*\* y \*\*\* difieren del control aleatorio ( $p \leq 0,05$ ;  $p \leq 0,01$  y  $p \leq 0,001$ , respectivamente) por el software Statview muestra que la monoterapia con OAS de TCTP redujo significativamente el volumen del tumor PC-3 en un 50 % desde los días 56 a 70 (\*\*,  $P \leq 0,01$ ). Las mediciones de tumores recogidos de animales que recibieron  
20 TCTP de OAS o control por i.p. durante dos semanas muestra claramente que los tumores recogidos de animales tratados con OAS de TCTP también tienden a ser un 50 % más pequeños en apariencia después de dos semanas de tratamiento (Fig. 9A). Además, el tratamiento con OAS de TCTP, en comparación con el control aleatorio, mejoró significativamente los efectos apoptóticos de docetaxel *in vivo*, reduciendo el volumen promedio del tumor PC-3 en <70 % en porcentaje, 13 semanas después del inicio del tratamiento (\*,  $P \leq 0,05$ ; FIG. 8, panel inferior).

25 **[0134]** Con el fin de ver si se observó apoptosis en tumores tratados con TCTP de OAS, las proteínas se extrajeron de tumores PC-3 recogidos tratados con OAS de TCTP o control solo. La presencia de fragmentos de caspasa-3 escindidos observada por el análisis de inmunoelectrotransferencia solo en tumores tratados con OAS de TCTP demuestra claramente que la administración i.p. de OAS de TCTP aumentó la apoptosis.

30 **[0135]** La ausencia de toxicidad del tratamiento en animales se estudió midiendo su peso corporal antes de la primera inyección (t0) y el día del sacrificio (tf) (Fig. 9B). Bajo las condiciones experimentales descritas anteriormente, no se observaron efectos adversos. De hecho, la Fig. 9B muestra que OAS de TCTP no causó una toxicidad general en los animales indicada por ningún cambio en el comportamiento o el peso corporal del animal.

35 **Ejemplo 10: OAS de TCTP de SEQ ID NO: 2 retrasa la progresión del tumor LNCaP después de la castración *in vivo*.**

**[0136]** Veinte ratones machos portadores de tumores LNCaP se castraron 6 a 8 semanas después del implante del tumor y se seleccionaron al azar para el tratamiento con OAS de TCTP de SEQ ID NO: 2 versus OAS de control. La castración se realizó cuando los tumores alcanzaron una media de 200 mm<sup>3</sup>. El volumen medio del tumor y el PSA fueron similares en ambos grupos al inicio del tratamiento. Comenzando 1 semana después de la castración, se administraron 10 mg/kg de OAS una vez al día por inyección i.p. durante 9 semanas. Como se muestra en la Figura 10, el volumen del tumor LNCaP aumentó más lentamente en ratones tratados con OAS de  
45 TCTP, en comparación con los tratados con OAS de control. Todos los ratones ( $n = 10$ ) tratados con castración más OAS de TCTP tuvieron una inhibición significativa del crecimiento del tumor Al durante las 9 semanas de análisis. En el momento del sacrificio, el volumen del tumor fue 4 veces mayor en el control (1650,  $15 \pm 281$ , 76 mm<sup>3</sup>) en comparación con el grupo tratado con OAS de TCTP (397,  $79 \pm 132$ , 61 mm<sup>3</sup>; \*,  $P \leq 0,05$ ). Las fotografías de los tumores recogidos de animales que recibieron TCTP de OAS o control durante 9 semanas (Fig. 11A) muestran que  
50 los tumores recogidos fueron 3/4 veces más pequeños en apariencia después de 9 semanas de monoterapia con OAS de TCTP. No se observaron efectos secundarios con OAS de TCTP o el tratamiento de control, como lo indica ningún cambio en el comportamiento o el peso corporal del animal (peso corporal antes de la primera inyección (t0) y peso corporal el día del sacrificio (tf)) (Fig. 11B).

**55 Ejemplo 11: Resumen de los resultados**

Efecto de los compuestos sobre el ARNm de TCTP y la expresión de proteínas en células de cáncer de próstata

60 **[0137]** La tinción de TCTP se realizó en micromatrices de tejido (TMA) de 335 pacientes que sufrían una de las siguientes enfermedades:

- Hiperplasia prostática benigna (BPH);
- Cáncer de próstata con una puntuación de Gleason de 3/4, en la que los pacientes no han sido tratados; o
- Metástasis de cáncer hepático, óseo, ganglio linfático y de próstata (CP), resistente a la castración (RC).

65

**[0138]** No se encontró expresión de TCTP en la BPH y en las glándulas normales de la próstata y solo el 10 % de Gleason  $\frac{3}{4}$  CP expresó TCTP antes de la castración. Sin embargo, se descubrió que TCTP estaba sobreexpresada de manera alta y homogénea en CP metastásico RC. La expresión de TCTP también se encontró ligeramente expresada en la estirpe celular de próstata normal inmortalizada con el virus simio SV40 (PNT2C2). La sobreexpresión de TCTP se descubrió en células CPRC (PC3) en comparación con las células LNCaP sensibles a la castración (SC).

**[0139]** Las pruebas de expresión de ARNm y proteínas TCTP se llevaron a cabo en células LNCaP y PC3 expuestas a un OAS de TCTP de SEQ ID NO: 2 o un ARNip de TCTP de SEQ ID NO: 3. El uso de estos compuestos disminuye de manera significativa la expresión en TCTP en estas células CP (Fig. 4).

#### Efectos antiproliferativos y proapoptóticos del ARNip de TCTP desarrollado en la estirpe celular CPRC

**[0140]** Las células PC3 se transfectaron con un ARNip de TCTP de SEQ ID NO: 3. La proliferación celular y la apoptosis se estudiaron usando, respectivamente, el ensayo bromuro (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio) MTT y citometría de flujo. El uso de este ARNip disminuyó significativamente (48,1 %) la proliferación de células PC3 y, por el contrario, aumentó el porcentaje (25,8) de células apoptóticas (Fig. 12).

#### Efectos antiproliferativos y proapoptóticos de la TCTP de OAS desarrollada en la estirpe celular CPRC PC3

**[0141]** Las células PC3 se transfectaron con un OAS de TCTP de SEQ ID NO: 2. La proliferación celular y la apoptosis se estudiaron usando respectivamente el ensayo MTT y la citometría de flujo. El uso de este OAS disminuyó significativamente (58 %) la proliferación de células PC3 y, por el contrario, aumentó el porcentaje (70) de células apoptóticas (Fig. 13) a través de la activación de caspasa-3.

#### Experimentos *in vivo* de la actividad antineoplásica aditiva de la inhibición de TCTP y el tratamiento con docetaxel en ratones desnudos xenoinjertados con PC3

**[0142]** La inhibición de TCTP se evaluó en ratones desnudos xenoinjertados con la estirpe celular CPRC PC3. Los animales se trataron todos los días y durante un período de dos meses mediante inyección peritoneal de OAS o TCTP de control una vez que su volumen tumoral fue de 200-300 mm<sup>3</sup>. Con el fin de evaluar la actividad antineoplásica aditiva de TCTP de OAS, los ratones se trataron con docetaxel (33 mg/kg) mediante inyección peritoneal tres veces por semana durante una semana antes de OAS o inyecciones de TCTP de control. Para todos los experimentos, el volumen promedio del tumor se midió una vez a la semana.

**[0143]** El tratamiento de ratones con TCTP de OAS indujo el mantenimiento del volumen tumoral a 500 mm<sup>3</sup> en comparación con el TCTP de control (OAS aleatorio) que midió más de 1.500 mm<sup>3</sup> en la décima semana de tratamiento (Fig. 8). Se observó que el tratamiento con docetaxel seguido de TCTP de OAS indujo en primer lugar una disminución del volumen del tumor y luego el mantenimiento del volumen del tumor a 100 mm<sup>3</sup>. Por el contrario, los volúmenes tumorales siguieron aumentando después de la novena semana de tratamiento con TCTP de control.

**[0144]** Estos resultados demuestran el significativo efecto antineoplásico aditivo de TCTP de OAS cuando se combina con un agente quimioterapéutico tal como el agente antimetabólico docetaxel.

**45 Ejemplo 12: La asociación de Hsp27 con TCTP implica su región C-terminal y depende del estado no fosforilado de la chaperona.**

#### *Materiales y métodos*

**50 Deleción de Hsp27 y transfección del mutante por fosforilación.**

**[0145]** Hsp27 TS etiquetada con histidina (His-tag) y tres mutantes de deleción (N1, N2 y C1) en pcDNA4 que contienen epítipo His-tag en el extremo N-terminal del fragmento insertado (Al-Madhoun AS. Y col., 2007, Mol Cell Endocrinol; 270) fueron proporcionados amablemente por Pr O'Brien (Ottawa University, Ontario, Canadá). Los mutantes de fosforilación (3D y 3A) en pcDNA3 que contiene una etiqueta de hemaglutinina (HA-tag) en el extremo N-terminal del fragmento insertado fueron proporcionados amablemente por Dr. Carmen Garrido (INSERM U866, Facultad de Medicina y Farmacia, Dijon, Francia). Las células LNCaP se transfectaron con 10 mg de TS, deleción o mutantes de fosforilación usando el reactivo de Eugene (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los lisados limpios se obtuvieron 48 h después de la transfección de acuerdo con nuestros experimentos anteriores (Rocchi P, y col., 2004, Cancer Res; 64: 6595-6602).

#### Inmunoprecipitación.

**[0146]** Se usaron lisados limpios con concentración de proteína ajustada (ensayo de proteínas, BioRad, Marnes-la-Coquette, Francia) para la inmunoprecipitación con anticuerpo de conejo anti-TCTP (Abcam Inc.,

Cambridge, Reino Unido) e IgG de conejo (rlgG; Millipore, Billerica, MA, EE. UU.) a 4 °C. Los inmunocomplejos se precipitaron después de 1 h de incubación con 30 µl de perlas de conejo de membrana verdadera (eBiosciences SAS, París, Francia) a 4 °C. Los complejos se suspendieron en tampón de muestra de proteínas (BioRad) y se hirvieron durante 5 minutos, se realizó el análisis de membrana de Western como se describió anteriormente (Rocchi P, y col., 2004, Cancer Res; 64:6595-6602) con anticuerpos secundarios anti-ratón y anti-conejo conjugados con HRP de membranas verdaderas (eBiosciences).

#### Resultados

10 **[0147]** Para analizar la interacción Hsp27-TCTP, se usó mutantes de delección Hsp27 descritos previamente por Al-Madhoun (Al-Madhoun AS y col., 2007, Mol Cell Endocrinol; 270:33-42). El mutante C-terminal Hsp27 N1 que tiene los aminoácidos 1 a 93 de la secuencia SEQ ID NO: 16, carece de parte del dominio de  $\alpha$ -cristalina, se cree que media en la oligomerización de Hsp27 (Ciocca DR. y col., 1993 J Natl Cancer Inst 85: 1558-1570). El mutante Hsp27 N2 que tiene los aminoácidos 1 a 173 de la secuencia SEQ ID NO: 16 carece del dominio flexible (caja IXI) en el extremo C-terminal, que se cree que está involucrado en la formación de múltiples interacciones entre subunidades (Leij-Garolla B. y col., 2005 J Mol Biol; 345: 631-642). Finalmente, el mutante N-terminal, Hsp27 C1 que tiene los aminoácidos 93 a 205 de la secuencia SEQ ID NO: 16, carece del dominio WDPF hidrófobo y los principales sitios de fosforilación necesarios para interactuar con otras proteínas y la función de la chaperona molecular (Lindquist S. y col., 1988, Annu Rev Genet; 22: 631-677).

15 **[0148]** La inmunoprecipitación de TCTP seguida de un análisis de inmunotransferencia con anticuerpo anti-polihistidina se realizó en células LNCaP transfectadas transitoriamente con construcciones que codifican formas mutantes truncadas de tipo salvaje (TS) etiquetadas con histidina o Hsp27 (N1, N2 y C1). TCTP fue capaz de interactuar con TS-Hsp27 y C1, mientras que se observó una interacción nula o débil con N1 y N2, respectivamente.

20 **[0149]** Curiosamente, solo la transfección con C1 protegió las células LNCaP y REG de la apoptosis inducida por docetaxel (una protección similar a la observada con TS-Hsp27). En contraste, la transfección con N1 o N2 sensibilizó las células LNCaP y REG a docetaxel, en comparación con las células transfectadas con TS-Hsp27. Estos resultados sugieren que la citoprotección inducida por Hsp27 en las células LNCaP parece implicar la interacción de TCTP.

25 **[0150]** Se ha demostrado que la fosforilación de los 3 residuos de serina (Ser) de Hsp27 (posición 15, 78 y 82) modula las funciones de Hsp27 (Gamido C. y col., 2002 Cell Death Differ; 9: 483-485). Para analizar el efecto de la fosforilación de Hsp27 en su asociación con TCTP, se usaron dos fosfo-mutantes (3D y 3A) de Hsp27. El mutante 3D tiene los tres residuos Ser 15, 78 y 82 de la secuencia SEQ ID NO: 16 reemplazados con aspartatos que imitan la proteína constitutivamente fosforilada. El mutante 3A tiene los tres residuos Ser 15, 78 y 82 de la secuencia SEQ ID NO: 16 reemplazados con alaninas que imitan la proteína constitutivamente desfosforilada. Se descubrió que el mutante 3A desfosforilado constitutivamente se unió a TCTP de manera más eficiente que el mutante 3D fosforilable. Por consiguiente, la fosforilación de Hsp27 disminuye considerablemente la interacción con TCTP. Sorprendentemente, no se encontró diferencia alguna en la quimiorresistencia de células LNCaP después de la transfección con TS, 3D o 3A. Este resultado indica que el estado de fosforilación de Hsp27 es importante para las interacciones con sus proteínas asociadas. Hsp27 parece interactuar con socios específicos que participan en la citoprotección de Hsp27 en ambos estados de fosforilación.

#### 45 LISTADO DE SECUENCIAS

##### **[0151]**

<110> INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM)

50 <120> ÁCIDOS NUCLEICOS QUE SE DIRIGEN A TCTP PARA SU USO EN EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER

<130> BEX 10P1296

55 <150> EP10306447.3

<151> 17-12-2010

<160> 40

60 <170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 172

<212> PRT

65 <213> *Homo sapiens*

ES 2 710 109 T3

<400> 1

```

Met Ile Ile Tyr Arg Asp Leu Ile Ser His Asp Glu Met Phe Ser Asp
 1           5           10           15

Ile Tyr Lys Ile Arg Glu Ile Ala Asp Gly Leu Cys Leu Glu Val Glu
      20           25           30

Gly Lys Met Val Ser Arg Thr Glu Gly Asn Ile Asp Asp Ser Leu Ile
      35           40           45

Gly Gly Asn Ala Ser Ala Glu Gly Pro Glu Gly Glu Gly Thr Glu Ser
      50           55           60

Thr Val Ile Thr Gly Val Asp Ile Val Met Asn His His Leu Gln Glu
 65           70           75           80

Thr Ser Phe Thr Lys Glu Ala Tyr Lys Lys Tyr Ile Lys Asp Tyr Met
      85           90           95

Lys Ser Ile Lys Gly Lys Leu Glu Glu Gln Arg Pro Glu Arg Val Lys
      100          105          110

Pro Phe Met Thr Gly Ala Ala Glu Gln Ile Lys His Ile Leu Ala Asn
      115          120          125

Phe Lys Asn Tyr Gln Phe Phe Ile Gly Glu Asn Met Asn Pro Asp Gly
 130          135          140

Met Val Ala Leu Leu Asp Tyr Arg Glu Asp Gly Val Thr Pro Tyr Met
 145          150          155          160

Ile Phe Phe Lys Asp Gly Leu Glu Met Glu Lys Cys
      165          170

```

5

<210> 2  
 <211> 20  
 10 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Oligonucleótido antisentido que se dirige a TCTP

15 <400> 2  
 accaatgagc gagtcatcaa 20

<210> 3  
 20 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> Artificial

<220>  
 25 <223> ARNip que se dirige a TCTP

<400> 3  
 aaccgucgc ggaucuccg g 21

ES 2 710 109 T3

<210> 4  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 5 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> oligonucleótido aleatorio  
  
 <400> 4  
 10 cgtgtaggta cggcagatc 19  
  
 <210> 5  
 <211> 829  
 <212> ADN  
 15 <213> *Homo sapiens*  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (153)..(173)  
 20 <223> Región dirigida por el ARNip de SEQ ID NO: 3  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (221)..(240)  
 25 <223> Región dirigida por el oligonucleótido antisentido de SEQ ID NO: 2  
  
 <400> 5  
  
 ccccccgagc gccgctccgg ctgcaccgcg ctcgctccga gtttcaggct cgtgctaagc 60  
 tagcgccgctc gtcgtctccc ttcagtcgcc atcatgatta tctaccggga cctcatcagc 120  
 cacgatgaga tgttctccga catctacaag atccgggaga tcgcgacgg gttgtgcctg 180  
 30 gaggtggagg ggaagatggt cagtaggaca gaaggtaaca ttgatgactc gctcattggt 240  
 ggaaatgcct ccgctgaagg ccccgagggc gaaggtaccg aaagcacagt aatcactggt 300  
 gtcgatattg tcatgaacca tcacctgcag gaaacaagtt tcacaaaaga agcctacaag 360  
 aagtacatca aagattacat gaaatcaatc aaagggaaac ttgaagaaca gagaccagaa 420  
 agagtaaaac cttttatgac aggggctgca gaacaaatca agcacatcct tgctaatttc 480  
 aaaaactacc agttctttat tggtgaaaac atgaatccag atggcatggt tgctctattg 540  
 gactaccgtg aggatggtgt gaccccatat atgattttct ttaaggatgg ttagaaatg 600  
 gaaaaatggt aacaaatgtg gcaattatit tggatctatc acctgtcatc ataactggct 660  
 tctgcttgtc atccacacaa caccaggact taagacaaat gggactgatg tcatcttgag 720  
 ctcttcattt attttgactg tgatttatit ggagtggagg cattgttttt aagaaaaaca 780  
 tgtcatgtag gttgtctaaa aataaaatgc atttaactc atttgagag 829  
  
 <210> 6  
 <211> 20  
 35 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> cebador  
  
 <400> 6  
 40 aaccccgat cggactacta 20

# ES 2 710 109 T3

<210> 7  
<211> 20  
<212> ADN  
5 <213> Artificial

<220>  
<223> cebador

10 <400> 7  
aataagctct agaggccgc 20

<210> 8  
<211> 23  
15 <212> ADN  
<213> Artificial

<220>  
<223> cebador

20  
<400> 8  
gaaagcacag taactactgg tgt 23

<210> 9  
25 <211> 21  
<212> ADN  
<213> Artificial

<220>  
30 <223> cebador

<400> 9  
gcagcccctg tcataaaagg t 21

35 <210> 10  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Artificial

40 <220>  
<223> cebador

<400> 10  
ctaccacatc caaggaagc 20

45  
<210> 11  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Artificial

50  
<220>  
<223> cebador

<400> 11  
55 tttcgtcac tacctccccg 20

<210> 12  
<211> 20  
<212> ADN  
60 <213> Artificial

<220>  
<223> cebador

65 <400> 12



# ES 2 710 109 T3

gggacgcggc gctcggcat 20  
<210> 13  
<211> 21  
5 <212> ADN  
<213> Artificial  
<220>  
<223> cebador  
10 <400> 13  
cagcagcaga gtattatca t 21  
<210> 14  
15 <211> 20  
<212> ADN  
<213> Artificial  
<220>  
20 <223> Oligonucleótido antisentido que se dirige a TCTP  
<400> 14  
aactgtttc ctgcaggatga 20  
25 <210> 15  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Artificial  
30 <220>  
<223> Oligonucleótido antisentido que se dirige a TCTP  
<400> 15  
tggttcatga caatatcgac 20  
35 <210> 16  
<211> 205  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*  
40 <400> 16

ES 2 710 109 T3

Met Thr Glu Arg Arg Val Pro Phe Ser Leu Leu Arg Gly Pro Ser Trp  
 1 5 10 15

Asp Pro Phe Arg Asp Trp Tyr Pro His Ser Arg Leu Phe Asp Gln Ala  
 20 25 30

Phe Gly Leu Pro Arg Leu Pro Glu Glu Trp Ser Gln Trp Leu Gly Gly  
 35 40 45

Ser Ser Trp Pro Gly Tyr Val Arg Pro Leu Pro Pro Ala Ala Ile Glu  
 50 55 60

Ser Pro Ala Val Ala Ala Pro Ala Tyr Ser Arg Ala Leu Ser Arg Gln  
 65 70 75 80

Leu Ser Ser Gly Val Ser Glu Ile Arg His Thr Ala Asp Arg Trp Arg  
 85 90 95

Val Ser Leu Asp Val Asn His Phe Ala Pro Asp Glu Arg Thr Val Lys  
 100 105 110

Thr Lys Asp Gly Val Val Glu Ile Ser Gly Lys His Glu Glu Leu Gln  
 115 120 125

Asp Glu His Gly Tyr Ile Ser Arg Cys Phe Thr Arg Lys Tyr Thr Leu  
 130 135 140

Pro Pro Gly Val Asp Pro Thr Gln Val Ser Ser Ser Leu Ser Pro Glu  
 145 150 155 160

Gly Thr Leu Thr Val Glu Ala Pro Met Pro Lys Leu Ala Thr Gln Ser  
 165 170 175

Asn Glu Ile Thr Ile Pro Val Thr Phe Glu Ser Arg Ala Gln Leu Gly  
 180 185 190

Gly Pro Glu Ala Ala Lys Ser Asp Glu Thr Ala Ala Lys  
 195 200 205

- 5 <210> 17
- <211> 20
- <212> ADN
- <213> Artificial

- 10 <220>
- <223> Oligonucleótido antisentido que se dirige a TCTP

<400> 17  
 taatcatgat ggcgactgaa 20

- 15 <210> 18
- <211> 20
- <212> ADN
- <213> Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido antisentido que se dirige a TCTP

5 <400> 18  
gctgatgagg tcccgtaga 20

<210> 19

<211> 20

10 <212> ADN  
<213> Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido antisentido que se dirige a TCTP

15 <400> 19  
tcggagaaca tctcatcgtg 20

<210> 20

20 <211> 20  
<212> ADN  
<213> Artificial

<220>

25 <223> Oligonucleótido antisentido que se dirige TCTP

<400> 20  
caggcacaac ccgtccgcga 20

30 <210> 21  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Artificial

35 <220>  
<223> Oligonucleótido antisentido que se dirige TCTP

<400> 21  
accatcttcc cctccacctc 20

40 <210> 22  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Artificial

45 <220>  
<223> Oligonucleótido antisentido que se dirige a TCTP

<400> 22  
50 tgttaccttc tgcctactg 20

<210> 23

<211> 20

<212> ADN

55 <213> Artificial 20

<220>

<223> Oligonucleótido antisentido que se dirige a TCTP

60 <400> 23  
ccttcagcgg aggcatctcc 20

<210> 24

<211> 20

65 <212> ADN

<213> Artificial

<220>  
<223> Oligonucleótido antisentido que se dirige a TCTP

5 <400> 24  
cagtaccttc gccctcgggg 20

<210> 25  
10 <211> 20  
<212> ADN  
<213> Artificial

<220>  
15 <223> Oligonucleótido antisentido que se dirige a TCTP

<400> 25  
accagtgatt actgtgctt 20

20 <210> 26  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Artificial

25 <220>  
<223> Oligonucleótido antisentido que se dirige a TCTP

<400> 26  
ctgtaggct tctttgtga 20

30 <210> 27  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Artificial

35 <220>  
<223> Oligonucleótido antisentido que se dirige a TCTP

<400> 27  
40 atgtaatctt tgatgtact 20

<210> 28  
<211> 20  
<212> ADN  
45 <213> Artificial

<220>  
<223> Oligonucleótido antisentido que se dirige a TCTP

50 <400> 28  
gtttcccttt gattgattc 20

<210> 29  
<211> 20  
55 <212> ADN  
<213> Artificial

<220>  
<223> Oligonucleótido antisentido que se dirige a TCTP

60 <400> 29  
ttctggtctc tgttctcaa 20

<210> 30  
65 <211> 20

<212> ADN  
<213> Artificial

<220>

5 <223> Oligonucleótido antisentido que se dirige a TCTP

<400> 30  
ataaagaact ggtagtttt 20

10 <210> 31  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Artificial

15 <220>  
<223> Oligonucleótido antisentido que se dirige a TCTP

<400> 31  
ctggattcat gtttcacca 20

20 <210> 32  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Artificial

25 <220>  
<223> Oligonucleótido antisentido que se dirige a TCTP

<400> 32  
30 caatagagca accatgcat 20

<210> 33  
<211> 20  
<212> ADN  
35 <213> Artificial

<220>  
<223> Oligonucleótido antisentido que se dirige a TCTP

40 <400> 33  
acaccatcct cacgtagtc 20

<210> 34  
<211> 20  
45 <212> ADN  
<213> Artificial

<220>  
<223> Oligonucleótido antisentido que se dirige a TCTP

50 <400> 34  
agaaaatcat atatggggtc 20

<210> 35  
55 <211> 20  
<212> ADN  
<213> Artificial

<220>  
60 <223> Oligonucleótido antisentido que se dirige a TCTP

<400> 35  
catttctaaa ccatccttaa 20

65 <210> 36

# ES 2 710 109 T3

<211> 20  
<212> ADN  
<213> Artificial

5 <220>  
<223> Oligonucleótido antisentido que se dirige a TCTP

<400> 36  
ttaacatttc tccatttcta 20

10 <210> 37  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Artificial

15 <220>  
<223> Oligonucleótido antisentido que se dirige a TCTP

<400> 37  
20 tctcccggat cttgtagatg 20

<210> 38  
<211> 20  
<212> ADN  
25 <213> Artificial

<220>  
<223> Oligonucleótido antisentido que se dirige a TCTP

30 <400> 38  
gtcataaaaag gttttactct 20

<210> 39  
<211> 20  
<212> ADN  
35 <213> Artificial

<220>  
<223> Oligonucleótido antisentido que se dirige a TCTP

40 <400> 39  
tgatttggtc tgcagcccct 20

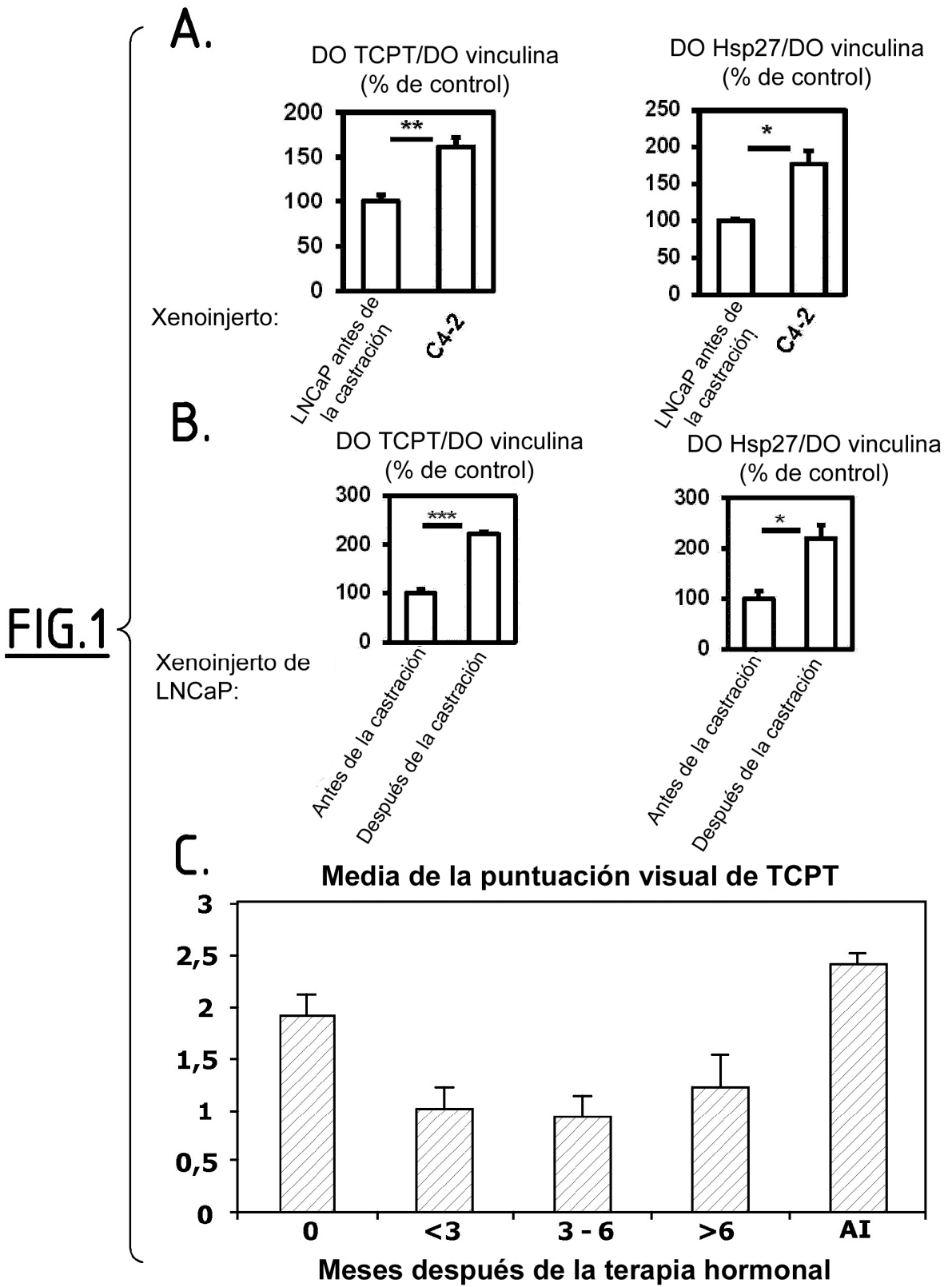
<210> 40  
<211> 20  
45 <212> AND  
<213> Artificial

<220>  
<223> Oligonucleótido antisentido que se dirige a TCTP

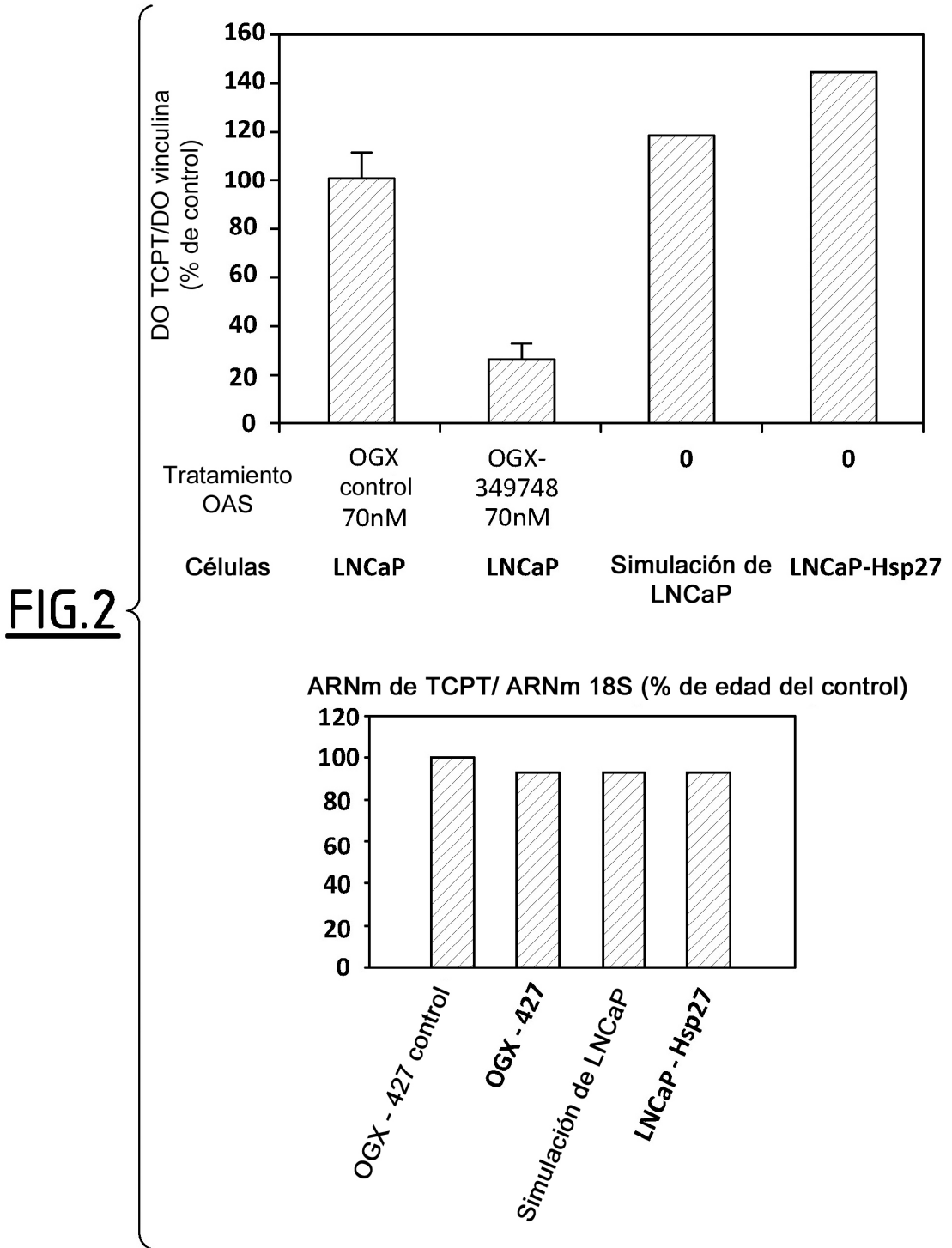
50 <400> 40  
gaaattagca aggatgtgct 20

## REIVINDICACIONES

1. Un antagonista de la proteína tumoral controlada traduccionalmente (TCTP) para su uso en el tratamiento o la prevención del cáncer, en el que dicho antagonista es un ácido nucleico que se dirige a un ARNm  
5 que codifica TCTP, en el que dicho ácido nucleico es capaz de reducir la cantidad de TCTP en las células, en el que dicho ácido nucleico tiene una longitud de 18 a 22 nucleótidos y en el que dicho ácido nucleico es un oligonucleótido antisentido (i) que comprende una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 38 y SEQ ID NO: 40 o (ii) que consiste en un fragmento de al menos 18  
10 nucleótidos consecutivos de una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 38 y SEQ ID NO: 40.
2. El antagonista de TCTP para su uso según la reivindicación 1, en el que dicho cáncer es un cáncer  
15 hormonoindependiente o un cáncer quimiorresistente.
3. El antagonista de TCPT para su uso según la reivindicación 1 o 2, en el que dicho cáncer es un cáncer hormonoindependiente o un cáncer de próstata quimiorresistente.
- 20 4. El antagonista de TCPT para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho ácido nucleico tiene una longitud de 19, 20 o 21 nucleótidos.
5. El antagonista de TCPT para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho ácido nucleico consiste en una secuencia seleccionada entre un grupo que consiste en SEQ ID NO: 2, SEQ ID  
25 NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 38 y SEQ ID NO: 40.
6. El antagonista de TCTP para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicho antagonista está destinado a un uso simultáneo o secuencial en combinación con un segundo agente  
30 antineoplásico.
7. El antagonista de TCPT para su uso según la reivindicación 6, en el que dicho segundo agente antineoplásico se selecciona entre el grupo que consiste en un agente antimetabólico, un agente alquilante, un antimetabolito, un inhibidor de la topoisomerasa, un inhibidor de la aromatasas, un inhibidor de la señalización, un  
35 anticuerpo monoclonal, un modificador de la respuesta biológica, un agente diferenciador y un agente que bloquea la formación de vasos sanguíneos.
8. El antagonista de TCPT para su uso según las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicho antagonista está destinado a uso simultáneo o posterior en combinación con una supresión androgénica.  
40
9. Un ácido nucleico que se dirige a un ARNm que codifica una proteína tumoral controlada traduccionalmente (TCTP), en el que dicho ácido nucleico:  
45
- es capaz de reducir la cantidad de TCTP en las células,
  - tiene una longitud de 18 a 22 nucleótidos, y
  - es un oligonucleótido antisentido (i) que comprende una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 38 y SEQ ID NO: 40 o (ii) que consiste en un fragmento de al menos 18 nucleótidos consecutivos de una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en SEQ ID NO:  
50 2, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 38 y SEQ ID NO: 40.
10. Un ácido nucleico según la reivindicación 9, en el que dicho ácido nucleico consiste en una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 25, SEQ  
55 ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 38 y SEQ ID NO: 40.







Análisis de cristal violeta

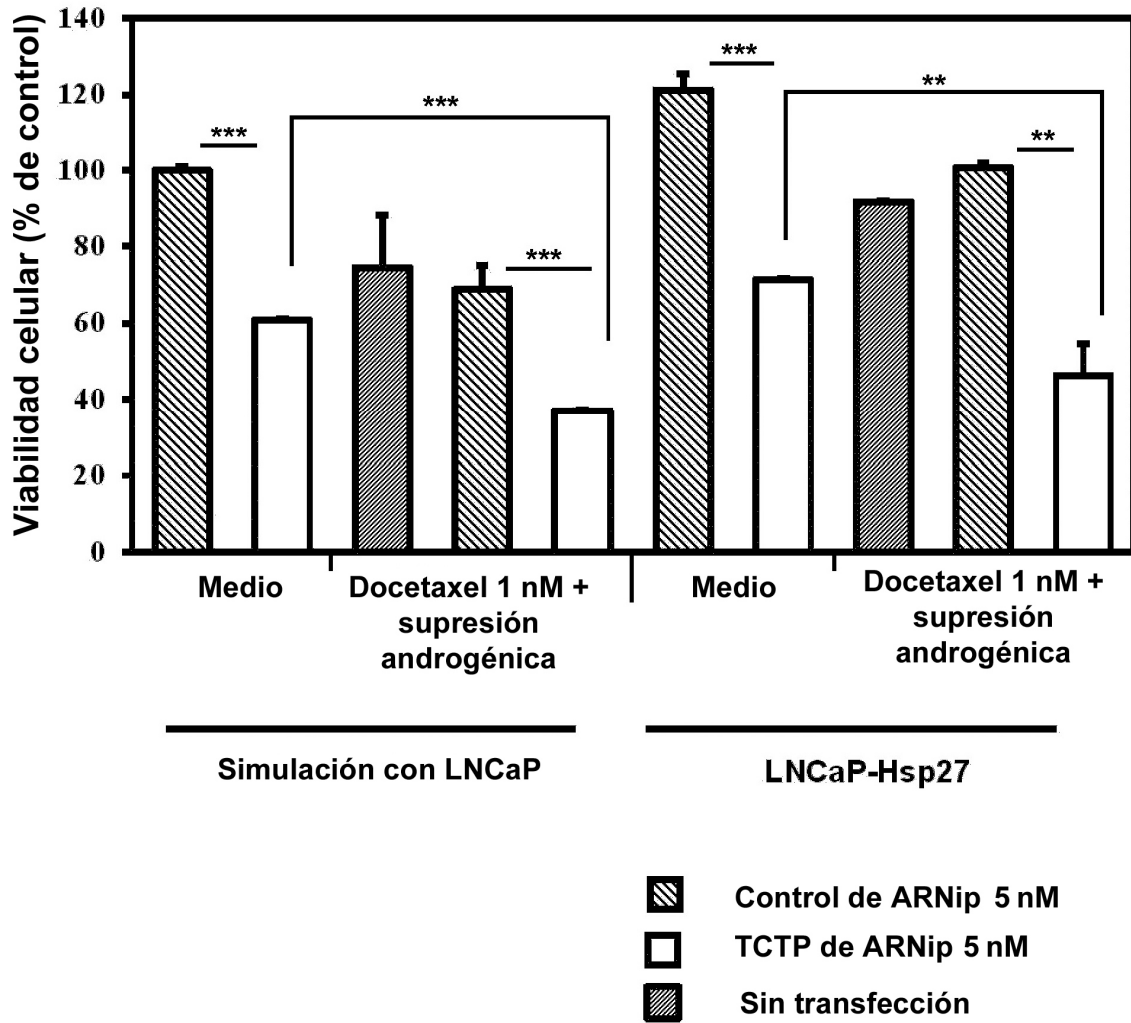
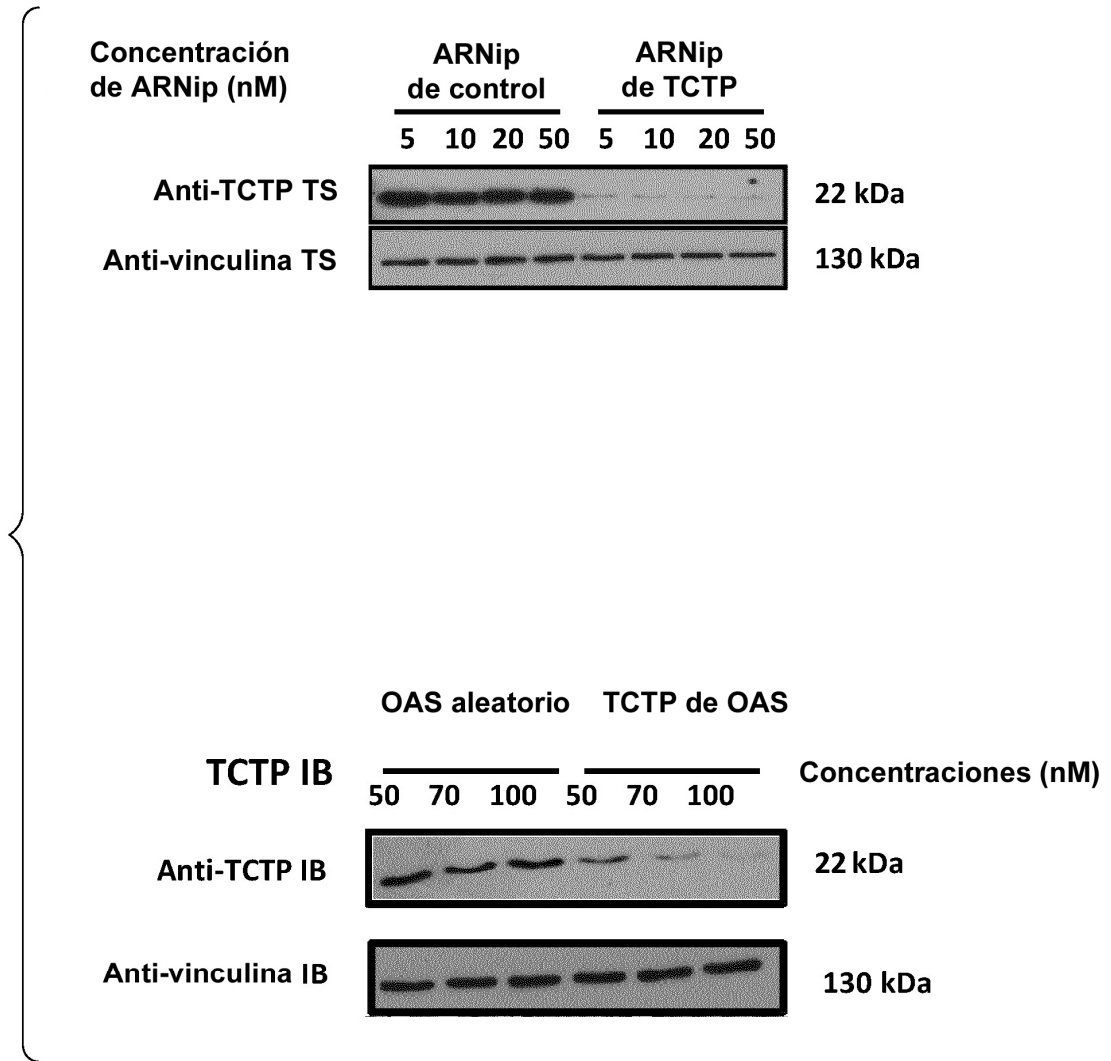
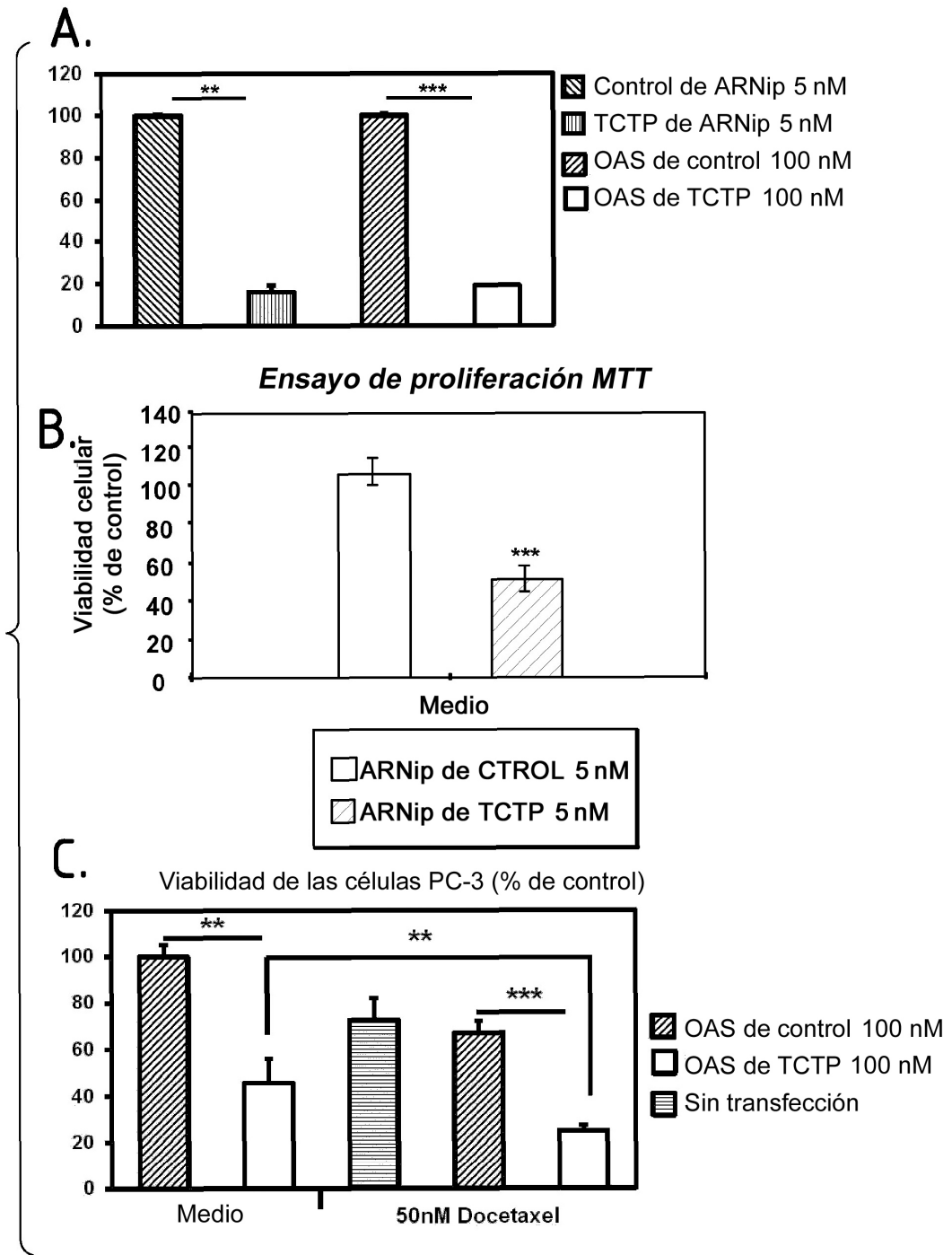


FIG.3

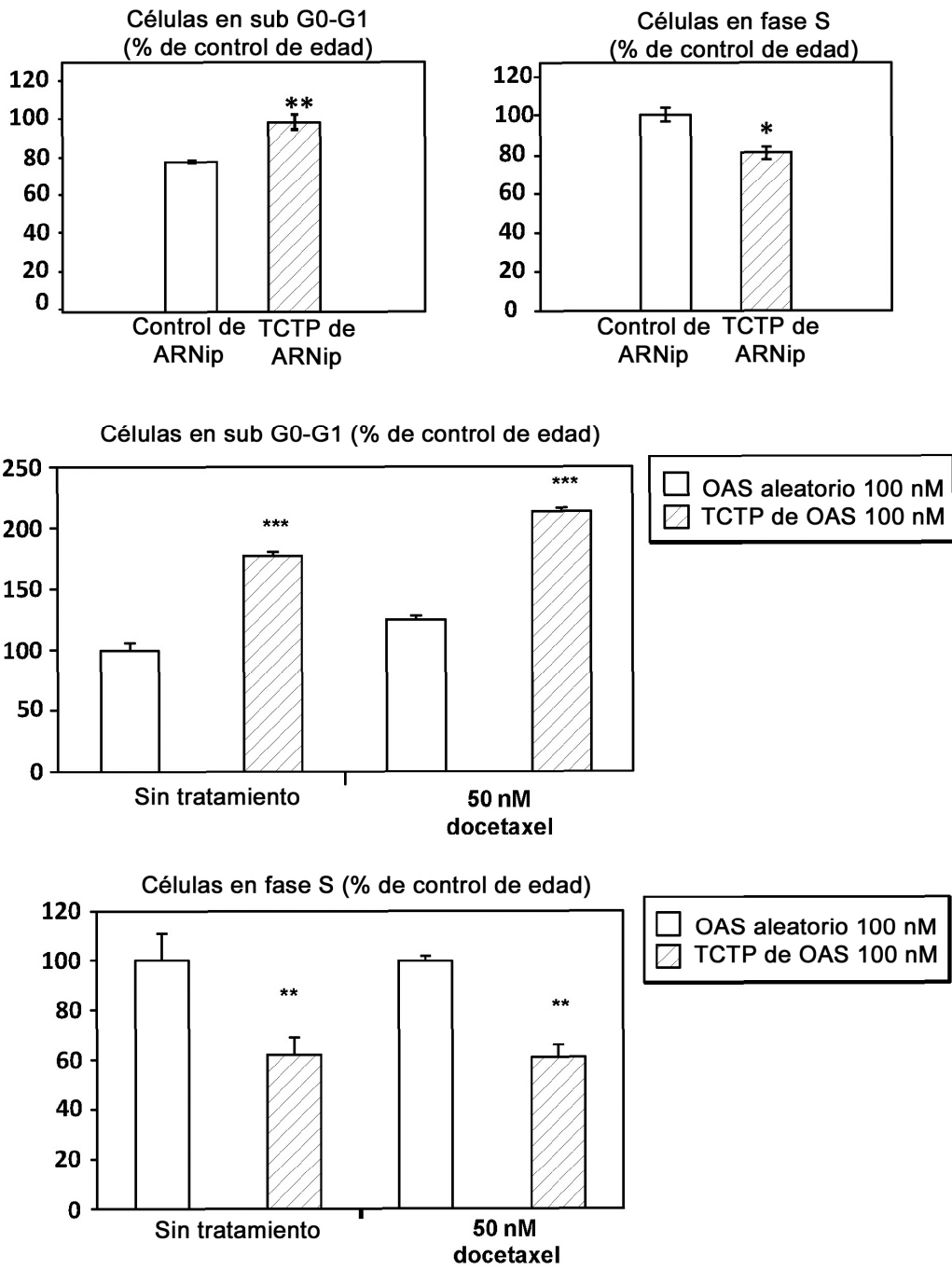


**FIG.4**



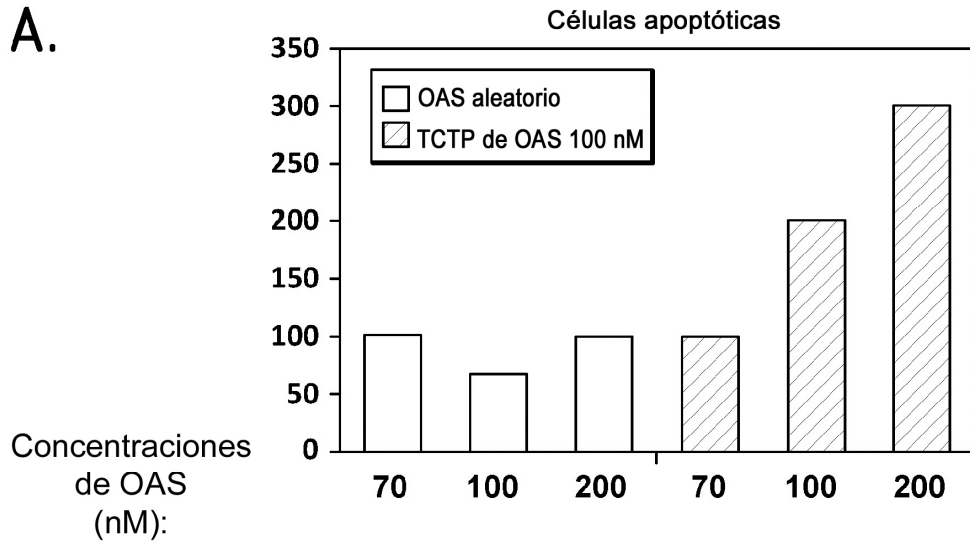
**FIG.5**

*Análisis de citometría de flujo*

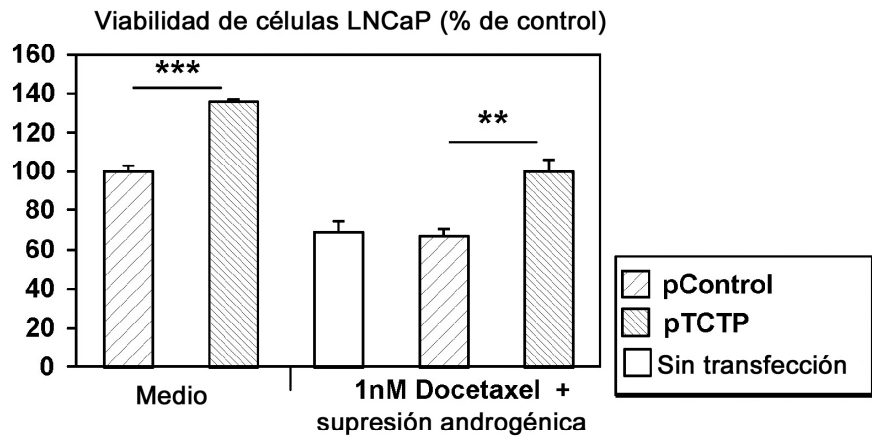


**FIG.6**

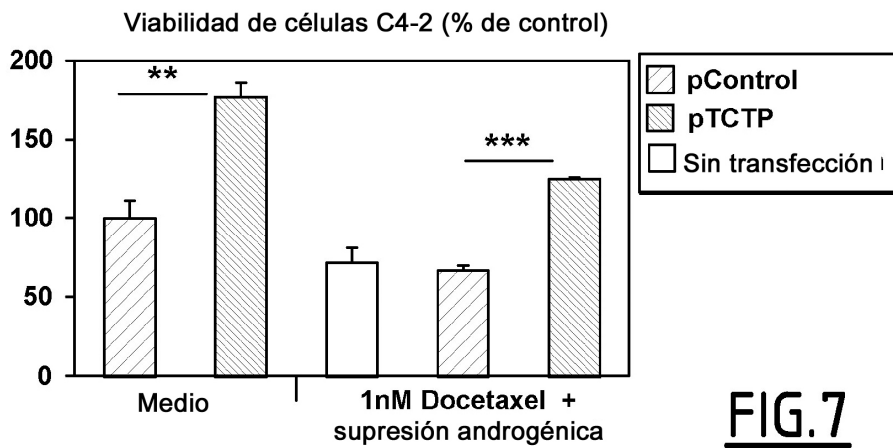
A.



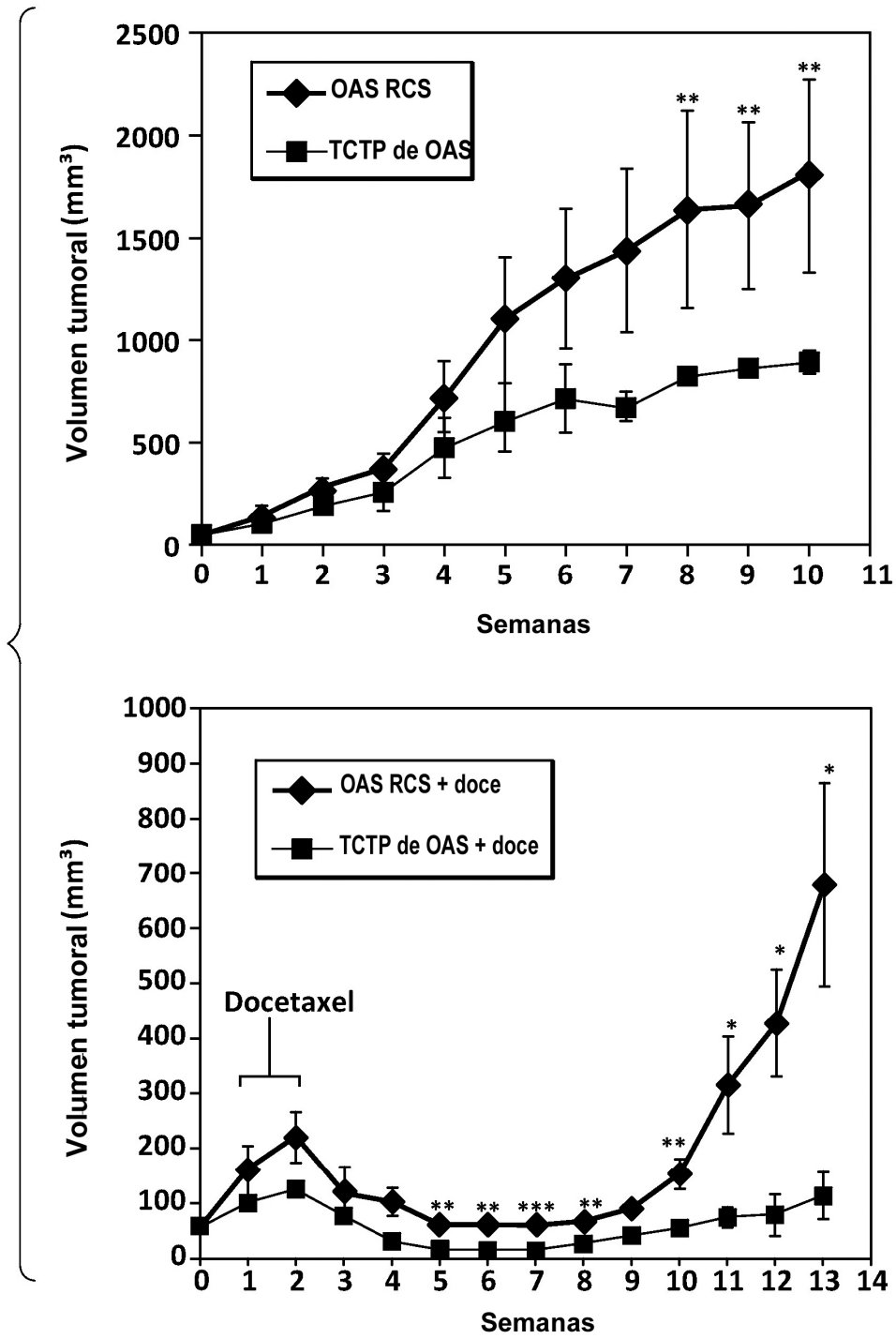
B.



C.



**FIG.7**



**FIG.8**

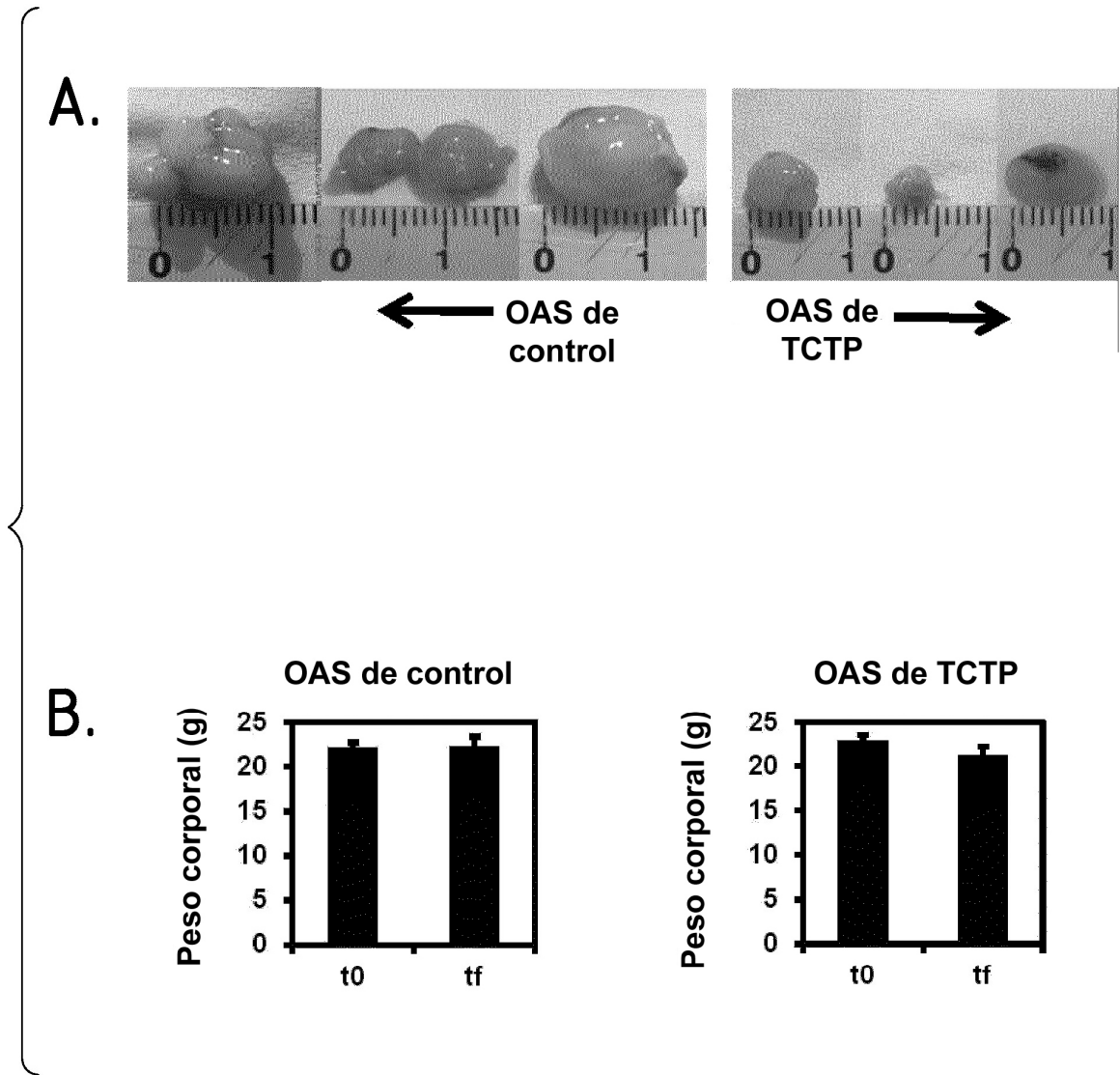
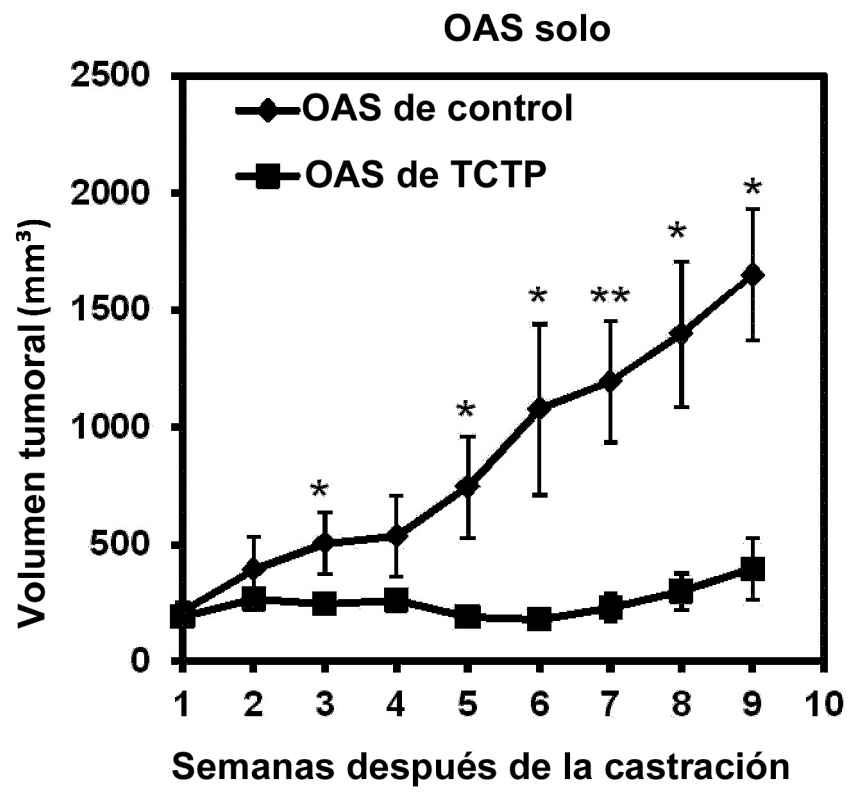


FIG.9





**FIG.10**

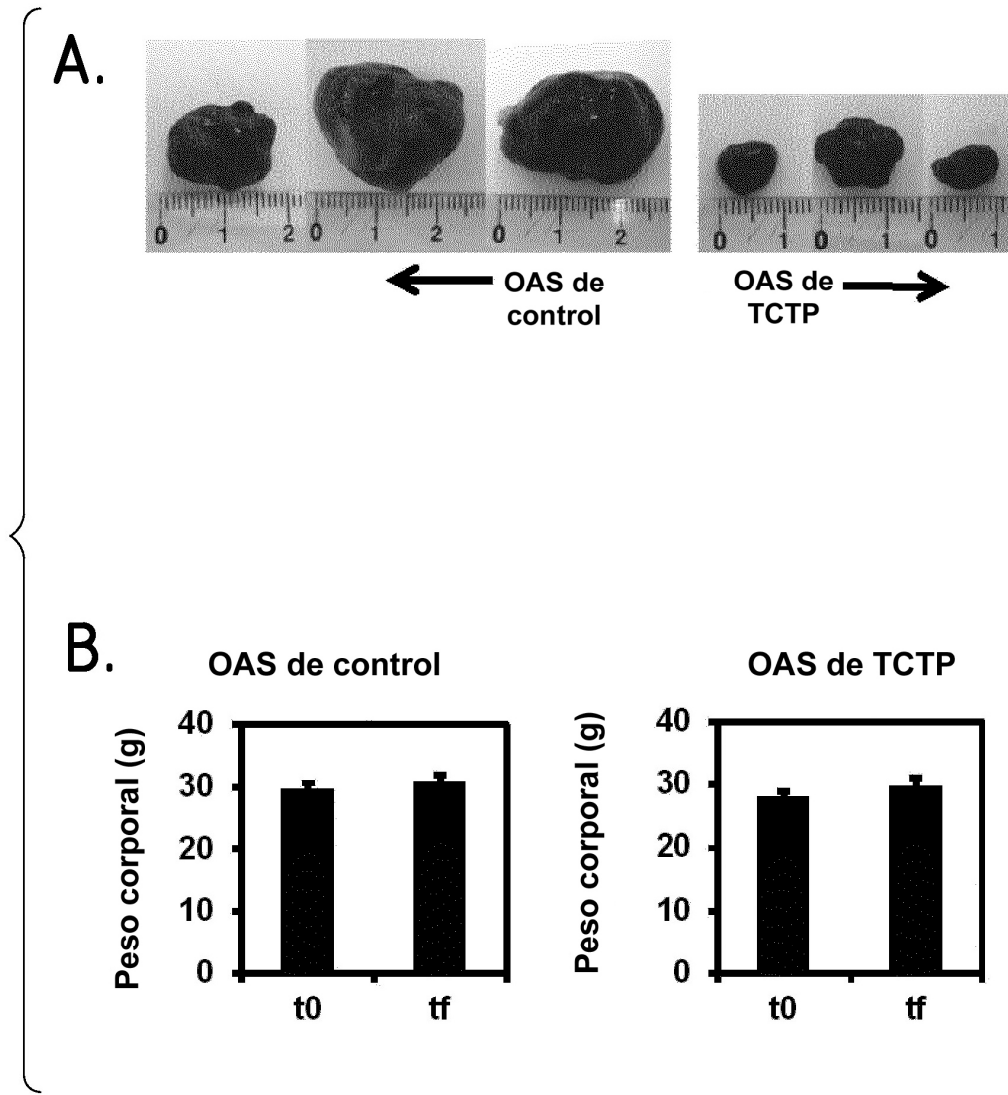
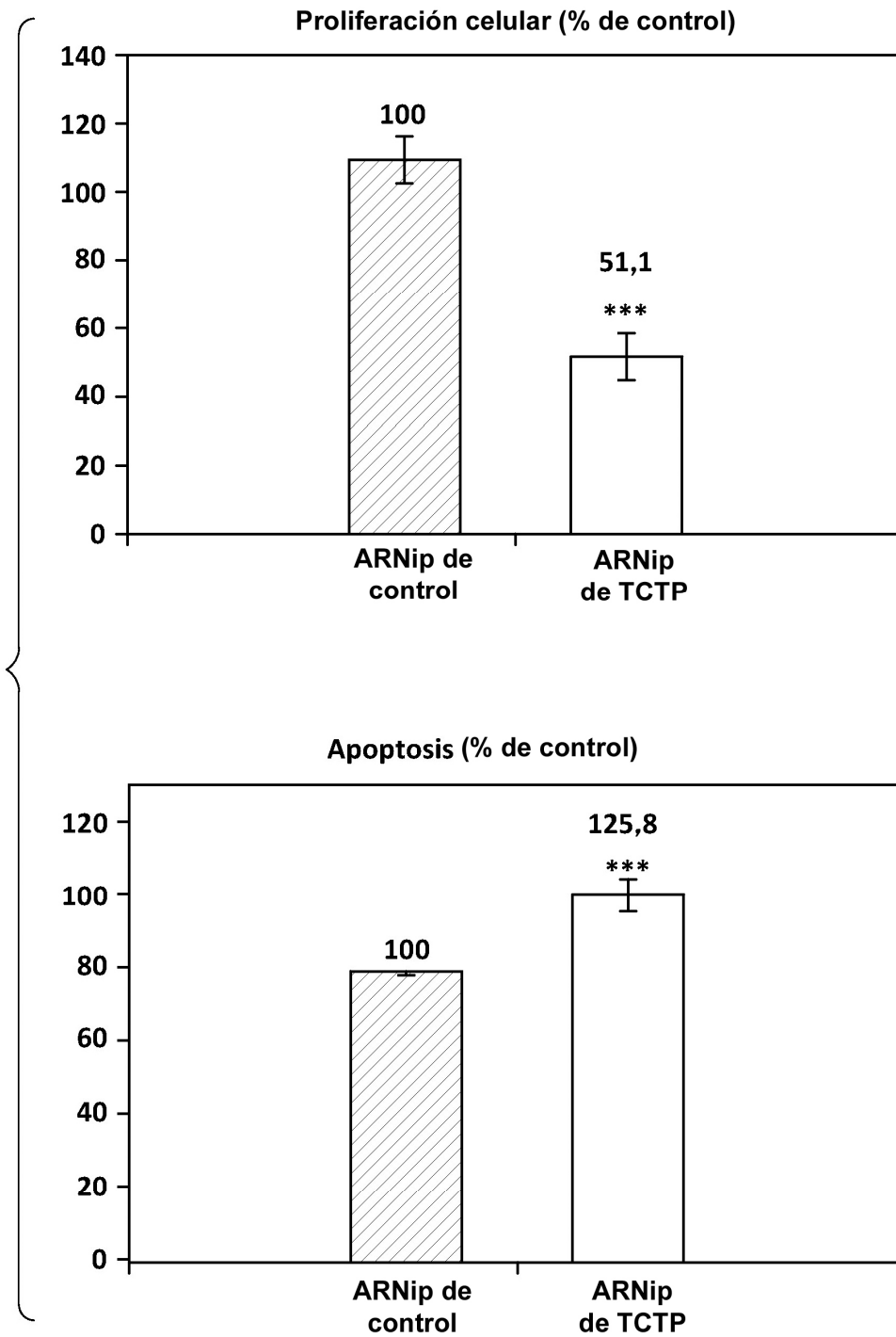
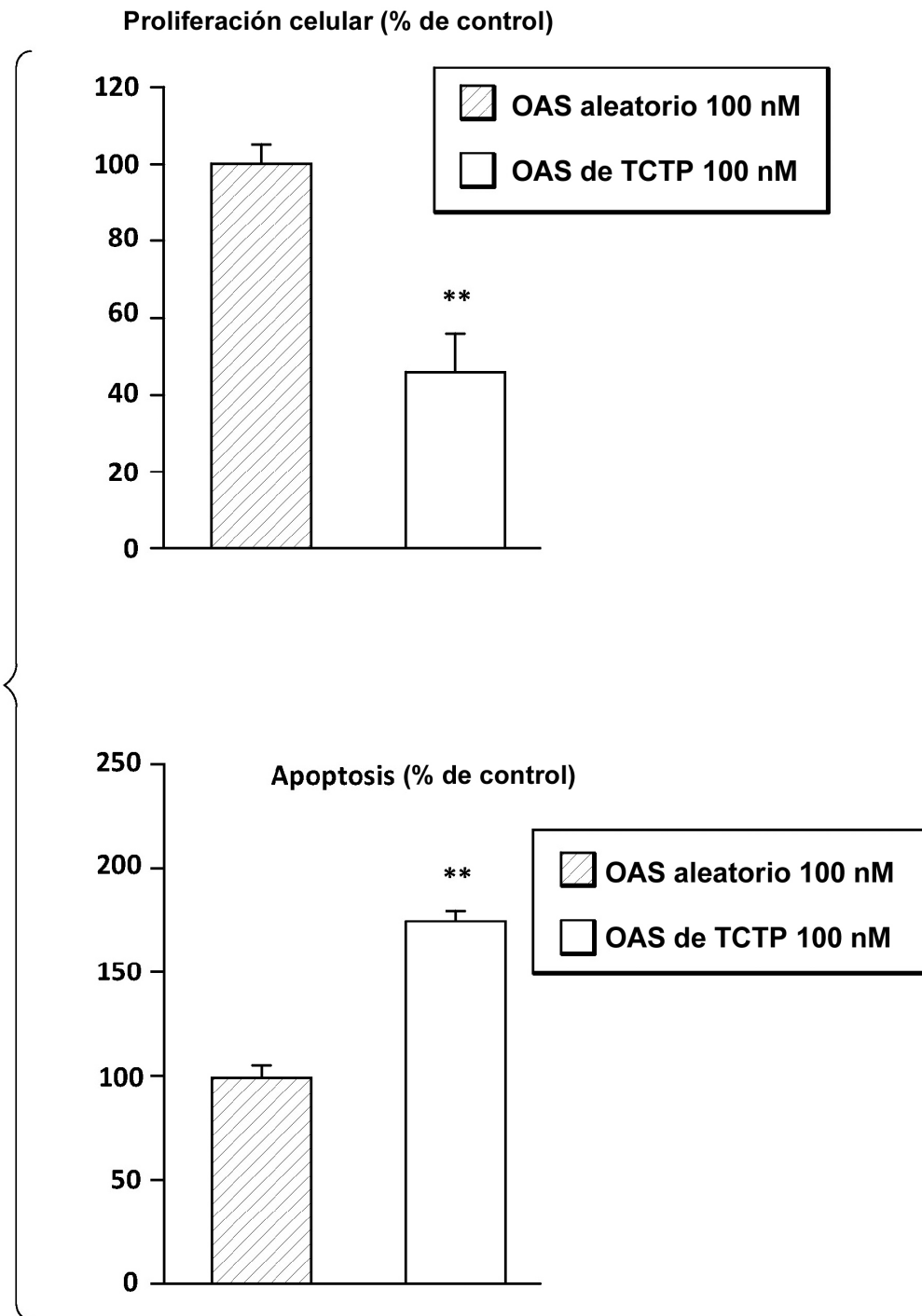


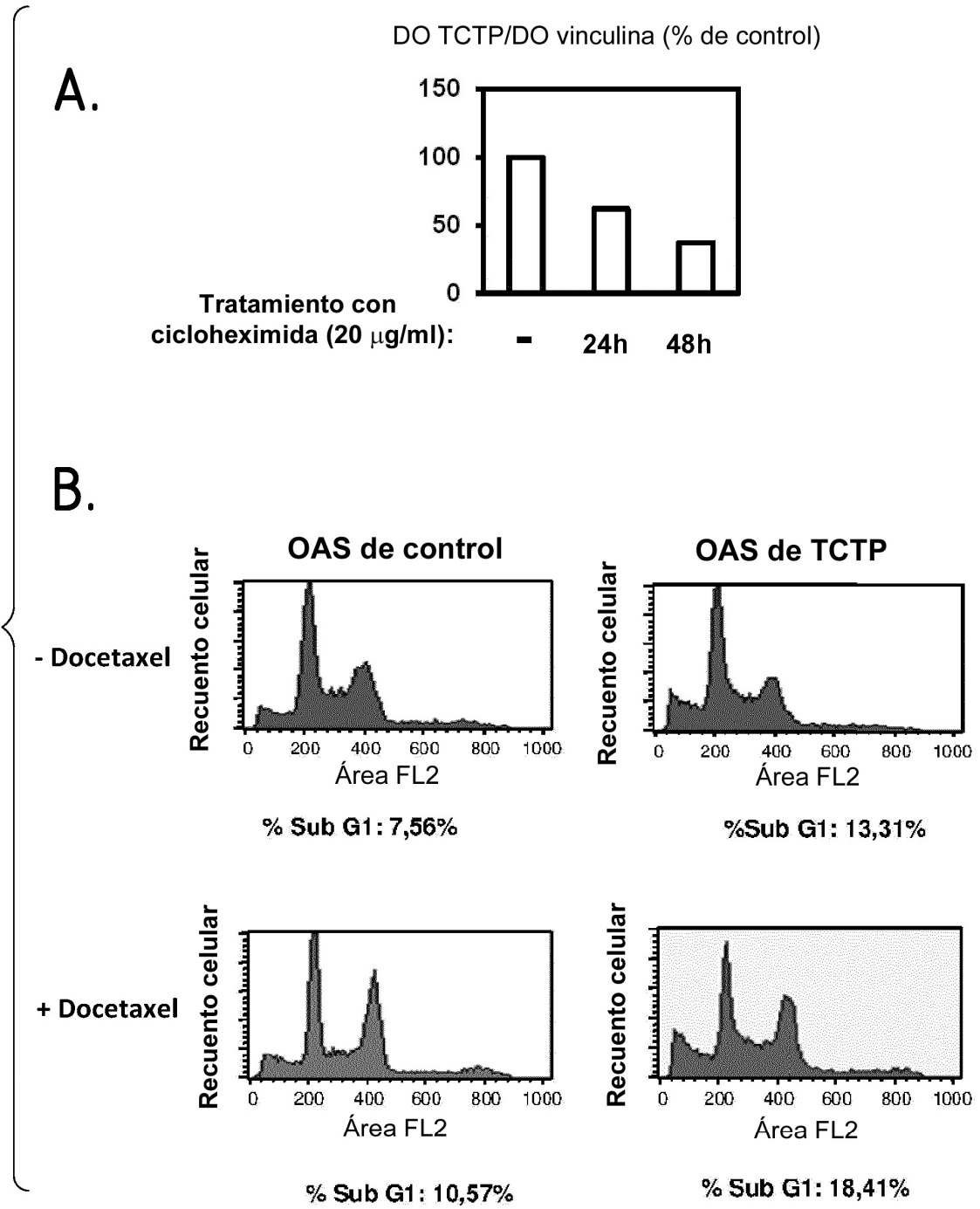
FIG.11



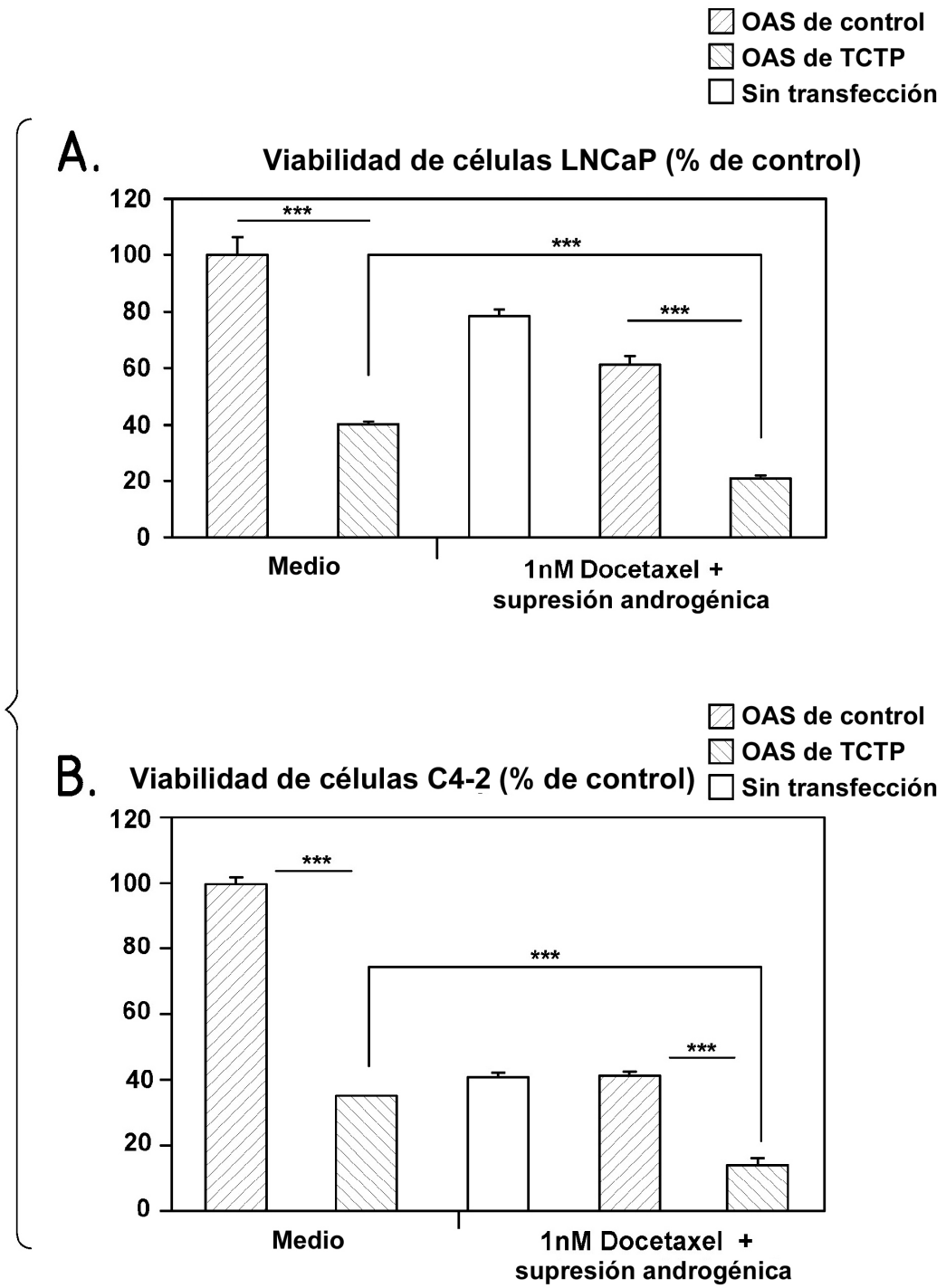
**FIG.12**



**FIG.13**

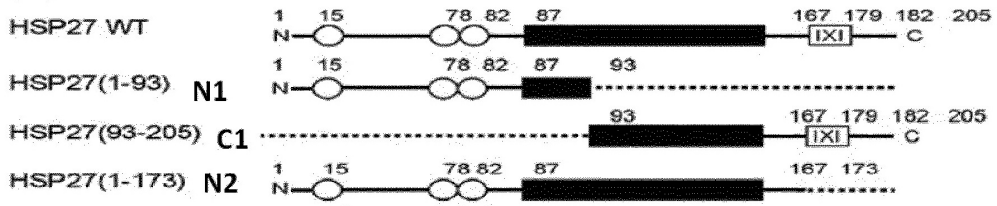


**FIG.14**

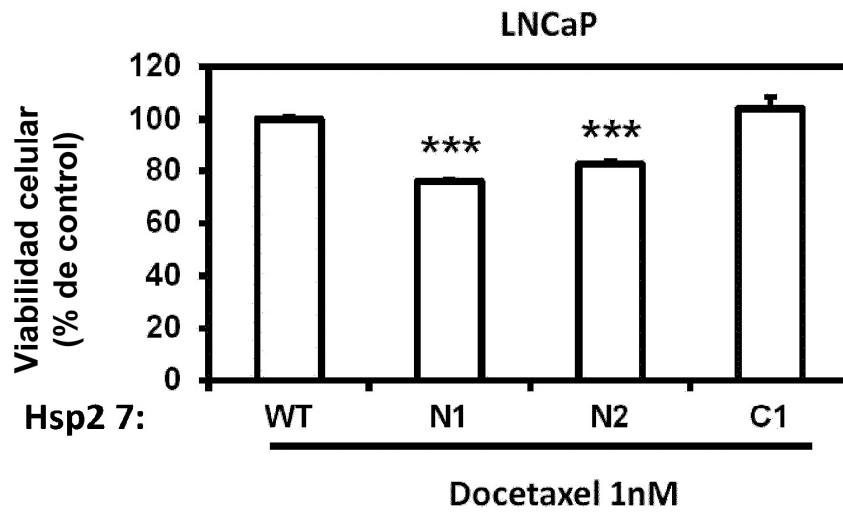


**FIG.15**

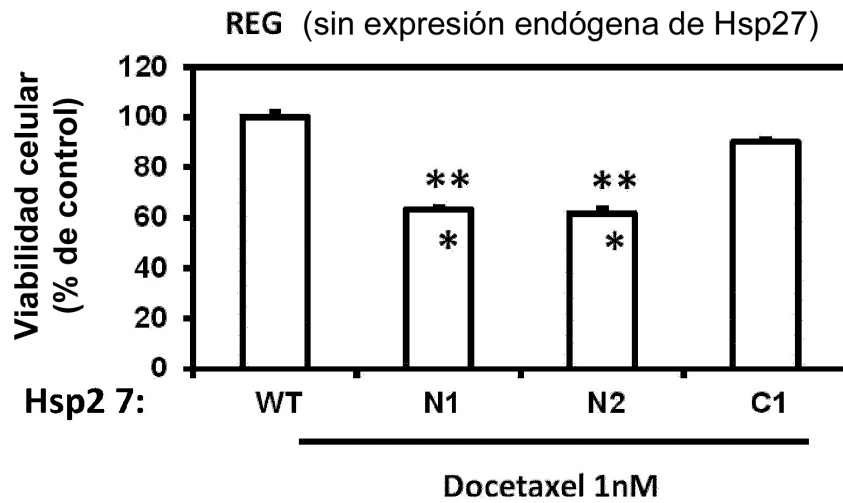
A.



B.

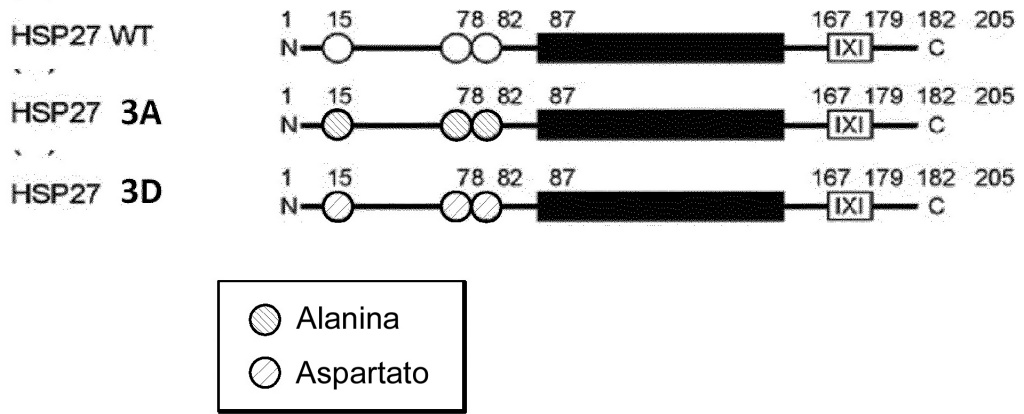


C.



**FIG.16**

A.



B.

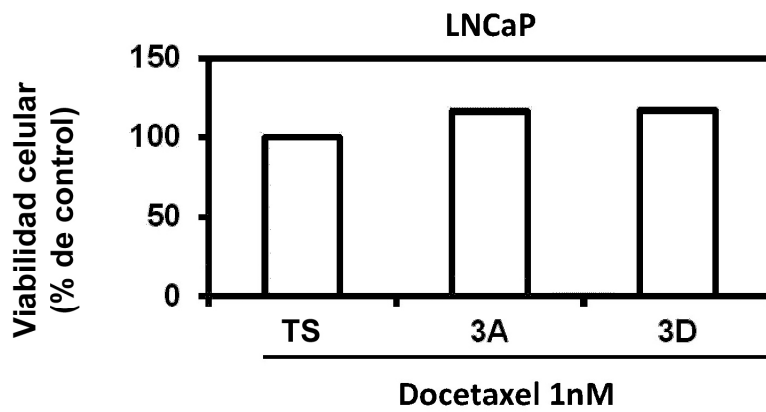


FIG.17